

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Departamento de Bioquímica**



**Caracterización de mutantes del gen *ABCB4*  
asociados a enfermedades hepáticas infantiles.  
*Análisis in vitro* del tratamiento con chaperonas  
farmacológicas.**

Raquel Gordo Gilart

Madrid, 2015



**Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid**



**Caracterización de mutantes del gen *ABCB4*  
asociados a enfermedades hepáticas  
infantiles. Análisis *in vitro* del tratamiento  
con chaperonas farmacológicas.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

**Raquel Gordo Gilart**

Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de la Tesis:

**Dr. Luis Álvarez García**

Investigador del SNS

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz





Dn. Luis Álvarez García, Investigador SNS del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz, certifica que:

Raquel Gordo Gilart, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **"Caracterización de mutantes del gen *ABCB4* asociados a enfermedades hepáticas infantiles. Análisis *in vitro* del tratamiento con chaperonas farmacológicas."**, en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz.

Considero que el mencionado trabajo reúne las condiciones exigidas para poder optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid, a 07 de enero de 2015.

Fdo. Luis Álvarez García

Director de la Tesis

Investigador del SNS

VºBº Tutor

José González Castaño

Catedrático



Esta Tesis ha sido realizada en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz, con una beca de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz y una ayuda de la Fundación ACS.





*A mis padres*

*A mi hermana*

*A Carles*



**Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado,  
un esfuerzo total es una victoria completa.**

**-Mahatma Gandhi**



## **Agradecimientos**



Nunca imaginé que algún día sería yo la que escribiera estas palabras. Y es que me da la sensación de que he llegado hasta aquí un poco por casualidades del destino. Cuando me paro a pensar en toda la gente a la que agradecerles su ayuda durante estos años me vienen a la cabeza tantos nombres que espero no dejarme a nadie.

En primer lugar quiero agradecerle a mi tutor, el Dr. Álvarez, todo el esfuerzo que ha hecho para conseguir que pudiera realizar esta Tesis. Muchísimas gracias, Luis, por confiar en mí, por ayudarme en todo lo que he necesitado, tanto a nivel laboral como personal, y por sacar siempre la parte positiva a las adversidades que se nos han presentado a lo largo de estos cuatro años. Tus palabras de ánimo y tu apoyo me han permitido superarlas más fácilmente.

Remontándome a mis inicios en el mundo de la investigación, quiero dedicarles unas palabras a mis antiguos compañeros del CBM.

Gracias a Kike, por la paciencia que tuvo y el empeño le que puso enseñándome a manejar en un laboratorio. Aún recuerdo esos dibujos que me hacías en el papel de filtro.

Gracias a Noe, por estar siempre disponible cuando la necesitaba. Empezó siendo una compañera y terminó siendo una amiga.

Gracias a Jaime, por esas largas conversaciones (muchas veces trascendentales, jeje) y por su disposición a ayudarme en cualquier momento.

Gracias a los tres, y al resto de compañeros del 303 y 304: Enri, JJ, Gon, Esperanza e Inma por los buenísimos momentos que disfruté ese año fuera y dentro del labo (y por los que seguimos compartiendo de vez en cuando).

También me gustaría agradecerle a la Dra. Bellón la oportunidad que me dio de poder realizar el proyecto final de máster en su laboratorio en IdiPAZ. Ella me enseñó la importancia de la dedicación y el esfuerzo en el trabajo para obtener buenos resultados.

Gracias a Esther, por las innumerables horas que pasó ayudándome (algunas veces hasta cerramos el edificio) y por sus buenos consejos; aún sigo aplicándolos.

Gracias a Salva por introducirme en el difícil mundo de la inmunología y las citometrías de flujo.

Gracias a Vir, por estar siempre ahí facilitándome las cosas y solucionándome los problemillas que me surgían.

Gracias Arancha por contagiarme tu alegría y por tu generosidad infinita, eres un sol!

Gracias a Sara, mi actual compi de labo, por ofrecerme su ayuda siempre, por darme ánimos aún cuando ella no los tenía y por los innumerables momentos de risas (y también de lágrimas) que hemos compartido. Y a Pilar, porque aunque ya no estaba en el labo cuando yo llegué, he tenido la oportunidad de conocerla fuera y de ver lo buena persona que es. Gracias chicas por los buenos recuerdos que me llevo y por las anécdotas vividas en los congresos que siguen haciéndonos reír cuando las recordamos.

Gracias a Ana, Lupe, Águeda, Belén y Vane, por esos desayunos interminables, por las quedadas fuera del labo (que espero sigamos disfrutando) y por vuestras palabras de ánimo. A Ana también quiero agradecerle su ayuda con las células siempre que lo he necesitado.

Gracias al resto de compañeros de la Unidad con los que he compartido tardes en cultivos memorables, pinchos de Navidad (con caipiriña y karaoke, incluidos) o cenas de verano que se alargaban hasta el amanecer. Sin todos esos momentos, mi estancia en el centro no habría sido la misma.

Me gustaría agradecer especialmente su apoyo a mis amigos más cercanos y sobre todo a mi familia:

Gracias a Jacopo y a los dos Javis por vuestra amistad, por aportar esa chispita al grupo y sobre todo por querer tanto a mis chicas.

Gracias a Paloma, Lauri, Clara y Almu por esas horas de conversaciones que siempre derivan en ciencia, por escucharme cuando lo he necesitado y por las innumerables buenas experiencias compartidas a lo largo de estos doce años (con Clara unos cuantos añitos más, qué recuerdos!). Gracias por haber sido y ser las mejores compañeras de universidad y amigas que pudiera tener.

Gracias a Carles por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia, por sacarme una sonrisa en las situaciones difíciles, por su paciencia en todos estos años y por quererme tal como soy.

Gracias a mi hermana, mi confidente, por su cariño infinito, por sus palabras de ánimo, por su sonrisa perpetua...y porque mi infancia habría sido mucho más aburrida sin ella.

Y, finalmente, gracias a mis padres por su amor incondicional, por permitirme hacer lo que más me gustaba, por no fallarme nunca y por hacer todo lo posible por verme feliz.



## **Resumen/Abstract**



El transportador canalicular MDR3 (ABCB4) es responsable de la secreción de fosfatidilcolina (PC) a la bilis, un proceso esencial para proteger las membranas celulares hepáticas de la acción detergente de las sales biliares. Mutaciones en el gen que la codifica (*ABCB4*) han sido asociadas a un amplio espectro de enfermedades hepatobiliares de distinta gravedad. Las formas más graves se manifiestan en la edad infantil y cursan con progresión a cirrosis y fallo hepático. Algunos niños afectados responden favorablemente al tratamiento crónico con ácido ursodesoxicólico (AUDC); en otros, el trasplante hepático constituye la única opción terapéutica. Se desconocen las razones de estas diferencias, aunque se ha postulado que obedecen a un distinto impacto de las mutaciones sobre la funcionalidad de MDR3. En este estudio se han identificado 18 mutaciones en *ABCB4* en una cohorte de niños con fenotipos clínicos sugerentes de deficiencia de MDR3. El impacto de estas mutaciones se ha evaluado *in vitro*, mediante la caracterización de los niveles de expresión, localización subcelular, y actividad transportadora de PC de los respectivos mutantes. Cuatro de las mutaciones identificadas comprometen la correcta localización de MDR3 en la membrana apical; el resto afecta en distinta medida a su capacidad para transportar PC. Los resultados obtenidos se han correlacionado con los datos clínicos de los pacientes. Los niños con mutaciones que causan una pérdida total o casi total (90%) de funcionalidad de MDR3 han manifestado enfermedad hepática progresiva, refractaria al tratamiento farmacológico, que ha hecho necesaria la realización de un trasplante hepático. Aquéllos que retienen al menos un 30% de la actividad estimada de MDR3 han mostrado una respuesta favorable al tratamiento crónico con AUDC. Las mutaciones G68R, G228R, D459H y A934T conducen a una expresión predominante de la forma inmadura de MDR3 y a la retención de la proteína en el retículo endoplásmico (RE). El tratamiento con dosis farmacológicas de 4-fenilbutirato o curcumina, dos compuestos de uso clínico con actividad chaperona, es capaz de restaurar la localización en membrana de los mutantes G228R y A934T, aunque sólo para el primero se evidencia recuperación en la actividad de MDR3. En resumen, los resultados de este trabajo aportan evidencia experimental de la correlación entre el impacto de las mutaciones de *ABCB4* y la evolución de la enfermedad hepática en los individuos que las portan. Para mutaciones específicas que causan la retención de MDR3 en el RE, la administración de chaperonas farmacológicas puede suponer una opción terapéutica.

The canalicular membrane protein MDR3 (ABCB4) mediates the efflux of phosphatidylcholine (PC) into bile. This phospholipid is essential to protect the cellular membranes of the biliary tree from the detergent action of free bile acids. Mutations in the gene encoding MDR3, *ABCB4*, have been identified in association with a wide spectrum of hepatobiliary diseases. The most severe forms present in infancy or childhood with persistent cholestasis that progress to cirrhosis and liver failure. Some affected children have a favourable response to chronic treatment with ursodeoxycholic acid (UDCA); liver transplantation is the only therapeutic option for nonresponders. The reasons for these differences are unknown, but it has been hypothesized to be determined by the extent to which *ABCB4* mutations compromise MDR3 function. In this study, we have identified 18 *ABCB4* mutations in a cohort of children with chronic cholestasis and suspected MDR3 deficiency. These mutations have been phenotyped *in vitro* by assessing their effects on MDR3 expression, subcellular localization, and PC transport activity. Four mutations prevented the protein from trafficking to the apical membrane. The remaining mutations did not affect apical expression of MDR3 but impaired PC-translocating activity to different extents. Children harbouring mutations causing complete or near-complete (90%) loss of MDR3 function developed severe liver disease refractory to pharmacological treatment and required liver transplantation. Patients who retained at least a 30% of MDR3 floppase activity favourably responded to chronic UDCA therapy. *ABCB4* mutations G68R, G228R, D459H and A934T caused a predominant expression of the immature form of MDR3 and an accompanying retention of the protein in the endoplasmic reticulum. Treatment with chaperones 4-phenylbutyrate or curcumin, two clinically approved compounds, restored membrane localization of G228R and A934T mutants at pharmacological doses. However, recovery of MDR3 activity was only evidenced for G228R mutant. In summary, these data provide experimental evidence of the correlation between the impact of *ABCB4* mutations and the clinical outcomes of patients harbouring such mutations. The use of pharmacological chaperones may represent a therapeutic option for patients carrying specific mutations that lead to retention of MDR3 in endoplasmic reticulum.

# Índice



<b>Agradecimientos</b> .....	xiii
<b>Resumen/Abstract</b> .....	xvii
<b>Índice</b> .....	1
<b>Abreviaturas</b> .....	5
<b>Introducción</b> .....	9
1. Colestasis .....	14
2. Colestasis intrahepática familiar progresiva .....	14
3. <i>ABCB4</i> y MDR3 .....	18
4. Mutaciones en <i>ABCB4</i> y enfermedad hepática .....	19
5. Potenciales abordajes terapéuticos para la deficiencia en MDR3 .....	20
<b>Objetivos</b> .....	23
<b>Materiales y Métodos</b> .....	27
1. Muestras biológicas .....	29
2. Análisis genético de pacientes .....	29
2.1 Secuenciación de ADN .....	29
2.2 Amplificación múltiple dependiente de ligasa .....	30
3. Inmunohistoquímica .....	30
4. Obtención de mutantes de MDR3 .....	30
5. Cultivo celular .....	31
6. Transfección transitoria en células MDCK-II y AD293 .....	32
7. Inmunofluorescencia y microscopía confocal .....	33
8. Electroforesis de proteínas e inmunotransferencia .....	33
9. Extracción de ARN .....	34
10. Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real .....	34

---

11. Determinación de la actividad flopassa de MDR3 .....	35
12. Análisis estadístico .....	36
<b>Resultados</b> .....	37
1. Identificación de defectos de MDR3 en niños con enfermedad colestática .....	39
2. Estudio del efecto de mutaciones en MDR3.....	45
2.1. Generación de mutantes.....	45
2.2. Estudio de localización subcelular .....	45
2.3. Estudio de expresión de MDR3 .....	50
2.4. Estudio de expresión de ARNm por PCR cuantitativa .....	53
2.5. Determinación de la funcionalidad de MDR3 .....	54
3. Correlación genotipo-fenotipo-efecto terapéutico .....	59
4. Rescate farmacológico de mutantes con retención en el retículo endoplásmico.....	61
3.1. Efecto de la temperatura sobre la localización subcelular de mutantes de MDR3. ....	61
3.2. Rescate de la localización apical de proteínas MDR3 mutantes mediante adición de chaperonas químicas .....	62
3.3. Análisis del patrón de expresión de los mutantes de MDR3 tratados con 4-PBA o curcumina. ....	64
3.4. Determinación de la actividad de mutantes de MDR3 tratados con 4-PBA o curcumina .....	65
<b>Discusión</b> .....	67
<b>Conclusiones</b> .....	81
<b>Bibliografía</b> .....	85
<b>Anexo</b> .....	99



## **Abreviaturas**



---

<b>AE2</b>	Proteína exportadora de aniones 2
<b>ASBT</b>	Transportador apical de sales biliares dependiente de sodio
<b>AUDC</b>	Ácido ursodesoxicólico
<b>BSEP</b>	Bomba exportadora de sales biliares
<b>CFTR</b>	Transportador de iones de cloro
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco
<b>FIC1</b>	Colestasis intrahepática 1
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FXR</b>	Receptor X farnesoide
<b>GGT</b>	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidasa
<b>ICP</b>	Colestásis intrahepática del embarazo
<b>MDR1</b>	Bomba exportadora para compuestos catiónicos hidrofóbicos 1
<b>MDR3</b>	Proteína traslocadora de fosfatidilcolina
<b>MLPA</b>	Amplificación múltiple de sondas dependientes de ligasa
<b>MRP2</b>	Proteína de resistencia a fármacos 2
<b>NBD</b>	Dominio de unión a ATP
<b>NCTP</b>	Transportador de taurocolato dependiente de sodio
<b>OA<sup>-</sup></b>	Aniones orgánicos
<b>OATP</b>	Proteína transportadora de aniones orgánicos
<b>OC<sup>+</sup></b>	Cationes orgánicos
<b>OST<math>\alpha</math></b>	Transportador de solutos orgánicos $\alpha$
<b>OST<math>\beta</math></b>	Transportador de solutos orgánicos $\beta$
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa

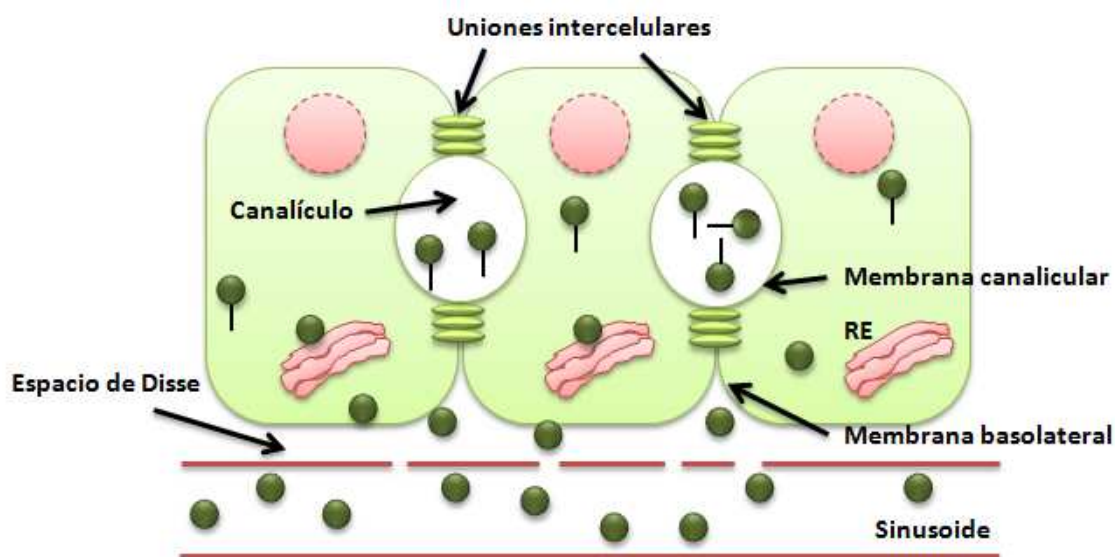
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PKC</b>	Proteína Kinasa C
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Receptor alfa activado de proliferación de peroxisomas
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>RXR</b>	Receptor X retinoide
<b>TBS</b>	Solución Tris base salino
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico

# Introducción



La bilis es una solución acuosa que contiene solutos orgánicos (sales biliares, fosfolípidos, colesterol, pigmentos biliares, glutatión y proteínas, así como múltiples metabolitos de sustancias endógenas y exógenas) e inorgánicos (fundamentalmente bicarbonato, cloro, sodio, potasio y calcio). Un humano adulto secreta diariamente 500-1000 ml de bilis, que tiene la doble función de eliminar compuestos potencialmente tóxicos y de proveer al intestino de moléculas detergentes que permiten la solubilización y absorción de grasas y vitaminas liposolubles (Dawson *et al.*, 2006). La formación de la bilis se inicia en los hepatocitos, donde los distintos solutos son excretados de forma activa al canalículo biliar. La elevada concentración de los mismos en la luz canalicular genera una fuerza osmótica que induce el flujo de moléculas de agua a través de las acuoporinas (Oude Elferink, Paulusma, 2007). Esta capacidad secretora de los hepatocitos está determinada por la polaridad estructural y funcional que presenta su membrana plasmática (Evans, 1980; Meier, 1988). Una parte de la misma, conocida como basal o sinusoidal, se encuentra en contacto casi directo con la sangre portal a través del espacio de Disse y forma, junto a la membrana lateral (adyacente a los otros hepatocitos), el denominado dominio basolateral. El otro dominio de la membrana plasmática, conocido como apical o canalicular, delimita el canalículo biliar, una estructura formada entre dos hepatocitos adyacentes, cuya luz viene a ser una expansión del espacio intercelular. Ambos dominios están separados por uniones intercelulares o *tight junctions*, que conforman una barrera anatómica entre la sangre portal y la bilis (Figura 1).

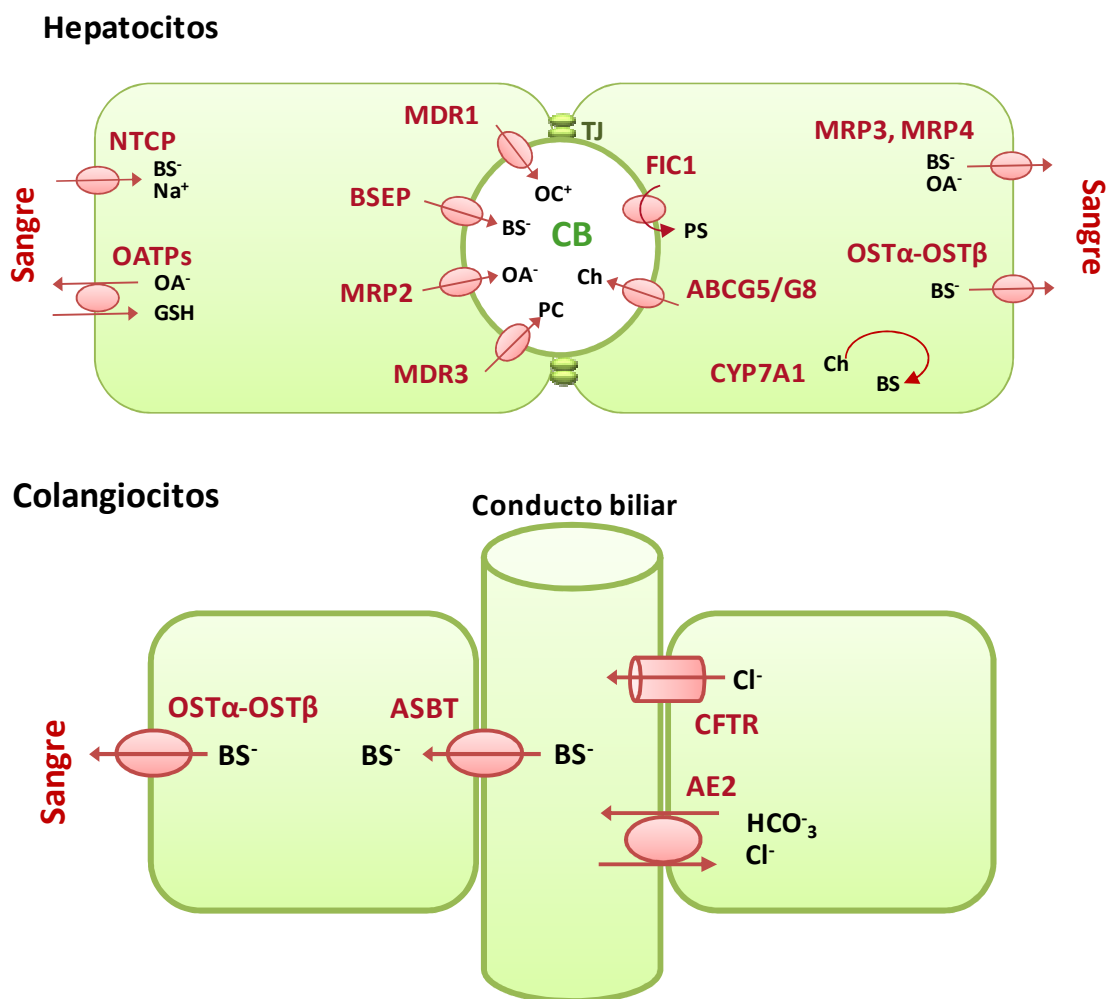
La disposición de los hepatocitos formando capas permite que los pequeños espacios canaliculares drenen a conductos conectores mayores, denominados conductos biliares, formados por células epiteliales biliares o colangiocitos. Estos conductos constituyen el árbol biliar, que finalmente converge en el colédoco, que comunica con el intestino. En su tránsito por el árbol biliar, la bilis es modificada mediante procesos de secreción y absorción que la fluidifican y alcalinizan.



**Figura 1. Polaridad de los hepatocitos.** Las membranas plasmáticas de los hepatocitos presentan un dominio apical o canalicular y otro basolateral. El primero comunica con el canalículo biliar, que constituye el compartimento de secreción; el segundo enlaza con la membrana sinusoidal a través del espacio de Disse, donde se produce el intercambio de metabolitos entre el hepatocito y la sangre portal. Las uniones intercelulares localizadas en la membrana lateral del hepatocito impiden el contacto entre la sangre y la bilis.

La excreción de los constituyentes biliares está mediada por diversos transportadores localizados en las membranas apicales del hepatocito y colangiocito (Figura 2), que pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC (de las siglas en inglés “ATP-binding cassette”), dado que su función requiere de la hidrólisis de ATP. La correcta formación de la bilis depende de la acción coordinada de estos sistemas de transporte. De hecho, la mayoría son regulados de forma simultánea por factores de transcripción o mecanismos postraduccionales en respuesta a estímulos metabólicos, hormonales o neurovegetativos (Geier *et al.*, 2007; Kullak-Ublick *et al.*, 2004). La pérdida de funcionalidad de alguno de estos transportadores conlleva una alteración en la composición de la bilis o una reducción del flujo biliar, fenómeno éste conocido como colestasis.





**Figura 2: Sistemas de transporte hepatobiliar.** Las sales biliares ( $BS^-$ ) se sintetizan en el hepatocito a partir de colesterol, en un proceso que requiere 17 reacciones enzimáticas. Las sales biliares monovalentes son excretadas al canalículo biliar (CB) por la bomba canalicular exportadora de sales biliares (BSEP), mientras que las divalentes y las conjugadas con aniones orgánicos ( $OA^-$ ) son secretadas por la bomba canalicular transportadora de aniones orgánicos (MRP2). Las sales biliares procedentes de la circulación enterohepática son internalizadas en el hepatocito a través del transportador de taurocolato dependiente de sodio (NCTP) o de las proteínas transportadoras de aniones orgánicos (OATPs), localizados en la membrana basolateral. La proteína MDR3 trasloca fosfatidilcolina (PC) desde la cara interna a la externa de la membrana canalicular, desde donde se libera a la luz del canalículo para formar micelas mixtas con sales biliares y colesterol (Ch). Los cationes orgánicos ( $OC^+$ ) son excretados por la proteína de resistencia a fármacos MDR1. FIC1 interviene en el mantenimiento de la integridad de la membrana canalicular, mediante la traslocación de fosfatidilserina (PS) desde la cara externa a la interna. El heterodímero ABCG5/G8 media el transporte de colesterol (Ch) a la luz canalicular. Las proteínas MRP3 y MRP4, asociadas con resistencia a fármacos, están localizadas en la membrana basolateral y suponen una ruta alternativa para la eliminación de sales biliares y otros conjugados desde el hepatocito a la circulación sistémica. Una parte de las sales biliares presentes en la bilis es reabsorbida por los colangiocitos a través del transportador apical de sales biliares dependiente de sodio (ASBT) e incorporadas a la sangre portal por el transportador heterodimérico de solutos orgánicos  $OST\alpha$ - $OST\beta$ . Las proteínas CFTR y AE2, localizadas en la membrana apical de los colangiocitos median la secreción de iones de cloro ( $Cl^-$ ) y bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), respectivamente.

## 1. Colestasis

Este término fue introducido por el anatomopatólogo Hans Popper en 1956 para definir la disminución o ausencia del flujo biliar. La colestasis da lugar, por una parte, a la acumulación en sangre y tejidos de sustancias potencialmente tóxicas normalmente excretadas por la bilis; por otra parte, a un insuficiente aporte de compuestos detergentes al intestino, que deriva en una deficiente absorción de grasas y vitaminas liposolubles. Tradicionalmente se ha distinguido entre colestasis extrahepática e intrahepática. La primera hace referencia a una lesión fibroobstructiva en los conductos biliares grandes; la segunda se asocia a alteraciones en la formación del árbol biliar intrahepático, o a defectos funcionales en la síntesis o transporte de los componentes biliares (Alvarez *et al.*, 2005).

La colestasis puede ser originada por múltiples causas, incluyendo infecciones, inflamación, cambios hormonales o fármacos. En estos casos, el fenómeno es transitorio: cuando cesa el insulto, los síntomas desaparecen. La colestasis reviste particular gravedad cuando es persistente y refractaria al tratamiento, porque la retención de componentes de la bilis en el hígado da lugar a un deterioro progresivo del órgano. Este es el caso de algunas entidades de carácter hereditario que obedecen a mutaciones en sistemas de transporte canalicular y que dan lugar a un síndrome denominado “Colestasis Intrahepática Familiar Progresiva” (Alvarez *et al.*, 2009) .

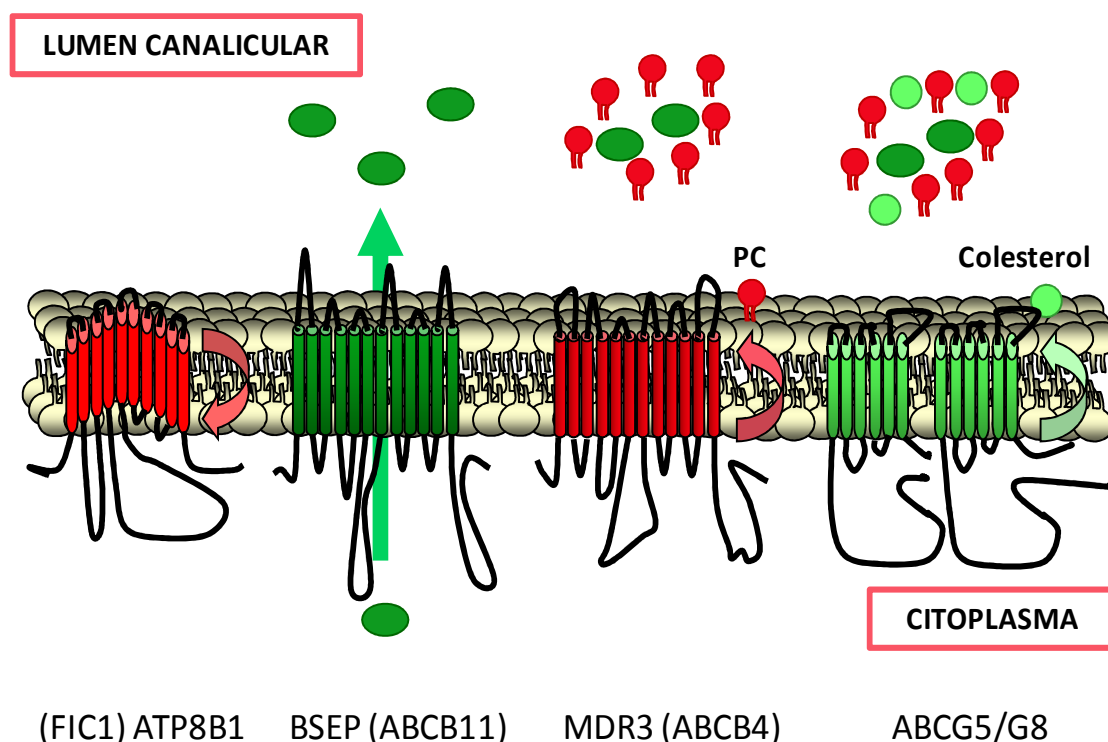
## 2. Colestasis intrahepática familiar progresiva

El término clínico de “Colestasis Intrahepática Familiar Progresiva” (CIFP) hace referencia a un grupo de enfermedades colestásicas de herencia autosómica recesiva que se desarrollan en el período neonatal o durante el primer año de vida y cursan con evolución rápida a cirrosis y fallecimiento del paciente durante la infancia por insuficiencia hepática (Balistreri *et al.*, 2005; Carlton *et al.*, 2004; van Mil *et al.*, 2005).

La primera descripción de la enfermedad data del año 1969, en un estudio realizado a la familia de un Amish llamado Jacob Byler, varios de cuyos hijos debutaron con ictericia, diarrea y esteatorrea, y manifestaron progresión del daño hepático y fallecimiento en la infancia. Siete miembros de cuatro familias emparentadas experimentaron los mismos síntomas y evolución. Al conjunto de manifestaciones clínicas que presentaban se le denominó “enfermedad de Byler”. En estudios posteriores, el análisis bioquímico e histológico realizado en otros pacientes con similar cuadro clínico evidenció la heterogeneidad de esta entidad. Así, se diferenciaron dos

grupos de pacientes en base a la actividad  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa (GGT) en suero: uno con niveles elevados de GGT; otro con niveles normales a pesar de la profunda colestasis crónica (Maggiore *et al.*, 1991; Maggiore *et al.*, 1987). Posteriormente, estudios moleculares y genéticos condujeron a la identificación de genes asociados a esta patología y permitieron una más precisa clasificación del grupo. Actualmente, se reconocen tres entidades de CIFP. La CIFP tipo 1 (OMIM 211600) está asociada a mutaciones en el gen *ATP8B1*, que codifica una ATPasa tipo P, denominada FIC1 o ATP8B1, implicada en el transporte de aminofosfolípidos desde la cara externa a la interna de la bicapa lipídica (Bull *et al.*, 1998; Klomp *et al.*, 2004) (Figura 3). *ATP8B1* se expresa en la casi totalidad de tipos celulares y en todos los tejidos. En el hígado, se ha evidenciado la localización de ATP8B1 en la membrana canalicular del hepatocito y en la apical del colangiocito (Eppens *et al.*, 2001). Se desconoce por qué la deficiencia de esta proteína da lugar a colestasis. Diversos trabajos lo asocian a una incorrecta distribución de fosfolípidos en las dos caras de la membrana canalicular del hepatocito, que afectaría a la funcionalidad de otros transportadores y restaría protección frente a la acción detergente de las sales biliares en el lumen canalicular (Paulusma *et al.*, 2006). Otros estudios sugieren un papel indirecto de ATP8B1 en el mantenimiento de la homeostasis de sales biliares, a través de una acción sobre el factor de transcripción FXR (Alvarez *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Frankenberg *et al.*, 2008; Martinez-Fernandez *et al.*, 2009). Los pacientes con CIFP-1 suelen presentar manifestaciones extrahepáticas diferenciales respecto a las otras entidades de CIFP, como diarreas exacerbadas, sordera o pancreatitis (Davitt-Spraul *et al.*, 2009; Egawa *et al.*, 2002). El diagnóstico preciso de esta entidad requiere la identificación de mutaciones en *ATP8B1*.

La CIFP-2 (OMIM 601847) obedece a mutaciones en el gen *ABCB11*, que codifica la proteína canalicular de exportación de sales biliares (BSEP), expresada únicamente en hígado (Strautnieks *et al.*, 1998; Thompson, Strautnieks, 2001). BSEP media el transporte de sales biliares primarios al canalículo biliar en contra de un gradiente extremo de concentración (Gerloff *et al.*, 1998; Noe *et al.*, 2002; Trauner, Boyer, 2003) (Figura 2). En la biopsia hepática de la mayoría de pacientes con mutaciones en el gen *ABCB11*, se ha observado, mediante técnicas de inmunohistoquímica, una ausencia total de BSEP en la membrana canalicular (Jansen *et al.*, 1999), lo cual supone una incapacidad para secretar sales biliares al canalículo. La patogenia de la enfermedad hepática es atribuida a la acumulación de sales biliares en el hepatocito, que produce un daño celular progresivo debido a sus propiedades detergentes. Asimismo, dado que las sales biliares son necesarios para la solubilización de lípidos, la ausencia de su secreción se traduce en mala absorción intestinal de lípidos y vitaminas liposolubles.



**Figura 3: Transportadores canaliculares.** FIC1 mantiene el enriquecimiento de aminofosfolípidos en la cara interna de la membrana canalicular. BSEP transporta sales biliares al lumen canalicular. MDR3 y ABCG5/G8 traslocan fosfatidilcolina (PC) y colesterol, respectivamente, a la cara externa de la membrana canalicular. Desde ahí son liberados al lumen canalicular para formar micelas mixtas con las sales biliares, neutralizando la acción detergente de éstas.

En la CIFP-2, la progresión a cirrosis es más rápida que en CIFP-1. Los niños afectados también presentan riesgo de desarrollar cáncer hepático (Knisely *et al.*, 2006; Strautnieks *et al.*, 2008). El análisis inmunohistoquímico de la biopsia hepática con anticuerpos anti-BSEP tiene validez diagnóstica en un 85-90% de casos de CIFP-2; en el resto, el diagnóstico de certeza precisa la secuenciación del gen (Alissa *et al.*, 2008).

Los niños con CIFP-1 y CIFP-2 presentan rasgos clínicos, bioquímicos e histológicos muy similares, a pesar de que los genes implicados, *ATP8B1* y *ABCB11* respectivamente, codifican proteínas de muy diferente función. La característica más llamativa en ambos casos es el mantenimiento de un valor normal de gammaglutamil transpeptidasa (GGT) en suero, a pesar de la profunda colestasis con elevación de sales biliares séricas, ictericia, esteatorrea y prurito intenso. Para la mayoría de niños afectados, el único tratamiento efectivo es el trasplante hepático (Alissa *et al.*, 2008).

A diferencia de CIFP-1 y CIFP-2, la CIFP-3 se caracteriza por la presencia de niveles muy elevados de GGT en suero y un patrón histológico de proliferación ductal. Esta entidad está

asociada a mutaciones en el gen *ABCB4*, que codifica la proteína de resistencia a fármacos MDR3, implicada en la secreción de fosfatidilcolina al canalículo biliar (Oude Elferink, Paulusma, 2007). El análisis de la bilis de algunos niños afectados ha revelado cantidades prácticamente indetectables de PC (Jacquemin *et al.*, 2001). De los fosfolípidos presentes en bilis, la PC es cuantitativamente el mayoritario (90-95%) (Alvaro *et al.*, 1986). Su secreción es imprescindible para formar micelas con las sales biliares, evitando los efectos detergentes de éstas (Figura 3). Consecuentemente, su déficit origina un predominio de sales biliares libres, no acomplejadas, que producen daño canalicular (Oude Elferink, Paulusma, 2007).

En la CIFP-3, los signos de enfermedad hepática (ictericia, prurito, hepatomegalia) se manifiestan más tarde que en las otras formas de CIFP (Davitt-Spraul *et al.*, 2009; Morotti *et al.*, 2011). También se diferencia en la variabilidad que se observa en los pacientes respecto a la evolución del daño hepático y respuesta al tratamiento farmacológico: algunos niños responden favorablemente a la administración crónica de ácido ursodeoxicólico (AUDC) y otros precisan la realización de un trasplante hepático.

Como en los otros tipos de CIFP, la filiación de CIFP-3 requiere de estudios moleculares. El análisis de la biopsia hepática mediante inmunohistoquímica sirve para diagnosticar la enfermedad cuando se aprecia tinción canalicular negativa frente al anticuerpo anti-MDR3. Sin embargo, en un número elevado de pacientes, la presencia de mutaciones en *ABCB4* no se correlaciona con la ausencia de la proteína en el dominio canalicular del hepatocito. En estos casos, el diagnóstico preciso reside en la identificación del defecto génico.

Es importante destacar que los rasgos clínicos en esta entidad pueden ser muy variables y solaparse con los de otras condiciones colestásicas. En todas las series descritas de niños con clínica sugerente de deficiencia en MDR3, se ha evidenciado un alto porcentaje de casos que no portan mutaciones en *ABCB4*. En la serie que recoge el mayor número de pacientes, procedentes de población europea, sólo se detectaron mutaciones en *ABCB4* en 28 de 81 (34.5%) casos (Colombo *et al.*, 2011). En otro estudio realizado en población europea, 17 de los 31 (54%) niños examinados portaban defectos en *ABCB4* (Davitt-Spraul *et al.*, 2010; Jacquemin *et al.*, 2001). Resultados similares se aprecian en una serie compuesta mayoritariamente por niños españoles, que constituye la base de los estudios recogidos en la presente memoria.

### 3. *ABCB4* y MDR3

MDR3 (siglas del término inglés “Multidrug Resistance Protein 3”) es una glicoproteína de 1286 aminoácidos perteneciente a la superfamilia de transportadores ABC (Dean *et al.*, 2001). Está codificada por el gen *ABCB4*, localizado en el cromosoma 7 (7q21), que comprende aproximadamente 75 kpb y posee 27 exones codificantes. Acorde con la nomenclatura oficial de estos transportadores, la proteína ha sido renombrada como ABCB4.

MDR3 está formada por dos mitades homólogas, cada una de ellas con 6 hélices transmembrana y un dominio de unión a ATP (NBD) (Vanderbliek *et al.*, 1988). Se expresa casi exclusivamente en la membrana canalicular del hepatocito (Ruetz, Gros, 1994; Smith *et al.*, 1998), donde actúa como una flopasa que traslada fosfatidilcolina (PC) desde la cara interna a la cara externa de la bicapa lipídica. La PC expuesta hacia el lumen canalicular es susceptible de extracción por las altas concentraciones de las sales biliares (Morita, Terada, 2014). El mecanismo exacto por el que las sales biliares secuestran PC no está bien definido. Como se ha mencionado anteriormente, en el lumen canalicular la PC se incorpora a micelas mixtas con colesterol para reducir la actividad detergente de las sales biliares sobre las membranas plasmáticas de las células del tracto biliar (Elferink *et al.*, 1997).

La función de esta proteína se identificó en estudios realizados en ratones deficientes (knockout) en *Mdr2*, el ortólogo murino de MDR3. Estos animales desarrollaban enfermedad hepatobiliar asociada a una drástica reducción de PC en bilis (Elferink *et al.*, 1995; Smit *et al.*, 1993). También presentaban una disminución en la secreción biliar de colesterol, atribuida a una deficiente solubilización del mismo en ausencia de fosfolípidos (Oude Elferink *et al.*, 1996). La acción traslocadora de MDR3 se confirmó, posteriormente, en estudios *in vitro*, desarrollados en vesículas secretoras de levaduras mediante la utilización de fosfolípidos fluorescentes (Ruetz, Gros, 1994; vanHelvoort *et al.*, 1996), o de fibroblastos que expresaban MDR3 mediante incubación con colina radioactiva (Smith *et al.*, 1994).

El gen *ABCB4* está localizado en el cromosoma 7 (7q21) y consta de 27 exones codificantes y aproximadamente 75 kpb (Vanderbliek *et al.*, 1987). La región promotora del gen fue clonada y caracterizada por Smit y colaboradores (Smit *et al.*, 1995). Posteriormente, varios autores identificaron variaciones génicas en esta región (Lang *et al.*, 2006; Pauli-Magnus *et al.*, 2004(A); Pauli-Magnus *et al.*, 2004 (B)) y caracterizaron funcionalmente haplotipos del promotor de *MDR3* (Jang *et al.*, 2012). Del mismo modo, también se han descrito zonas de unión a receptores nucleares que actúan como factores de transcripción (Karpen, 2002). Los dos

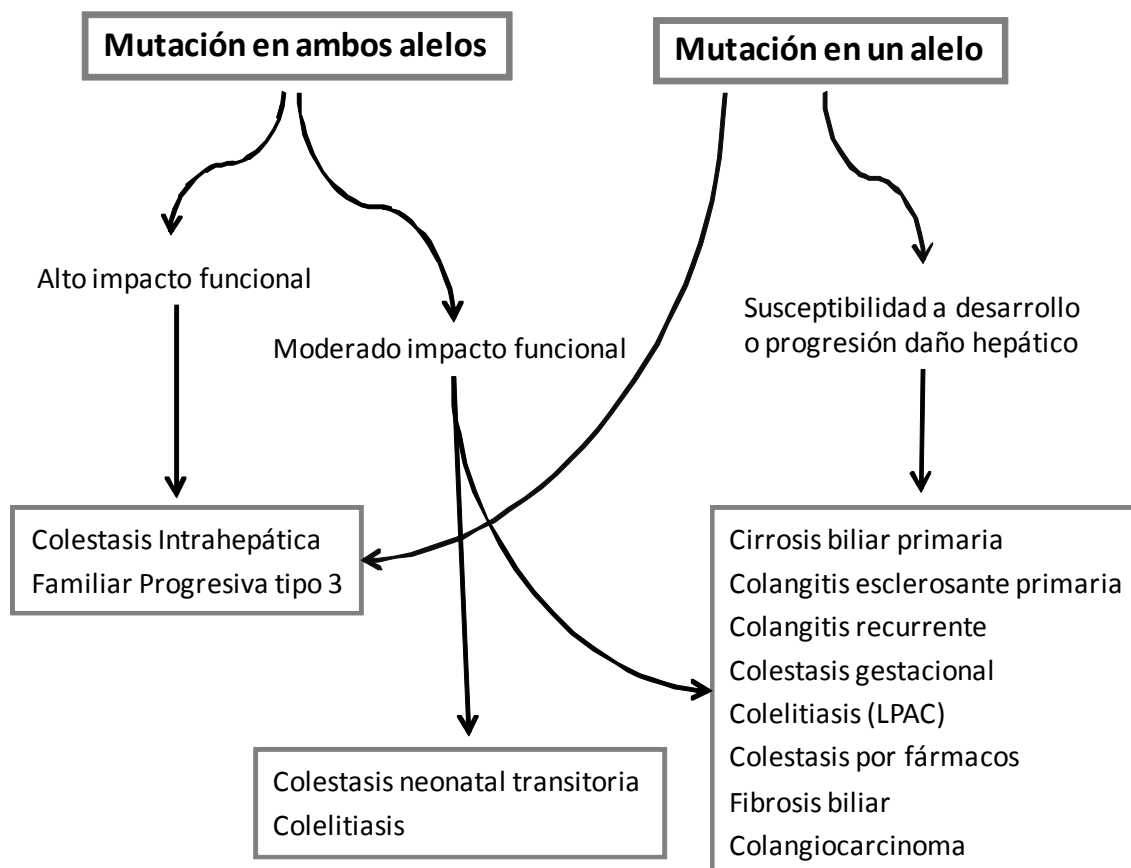
receptores nucleares principales que regulan la expresión de *ABCB4* son FXR y PPAR $\alpha$ , que heterodimerizan con el receptor RXR (Chianale et al., 1996; Huang et al., 2003; Shoda et al., 2007). El gen *ABCB11* (*BSEP*) también está regulado por estos dos heterodímeros (Ananthanarayanan et al., 2001; Li et al., 2012). Por tanto, los niveles de expresión de *ABCB4* y *ABCB11* están íntimamente unidos y controlados por las concentraciones intracelulares de sales biliares, que activan FXR (Makishima et al., 1999).

Por otro lado, apenas se conocen mecanismos de regulación postraducciona de MDR3. Recientemente se ha descrito que la fosforilación de residuos localizados en la región amino terminal de la proteína puede modular su actividad. La kinasa que parece estar implicada en este proceso es la proteína kinasa C (PKC) (Gautherot et al., 2014).

#### 4. Mutaciones en *ABCB4* y enfermedad hepática

La deficiencia funcional de MDR3 ha sido asociada al desarrollo de un amplio espectro de enfermedades hepatobiliares de gravedad variable. Además de en niños con CIFP-3, mutaciones en *ABCB4* se han identificado en pacientes adultos con distintos trastornos colestásicos (Figura 4). Se presume que esta variabilidad en fenotipos obedece a la penetrancia de la mutación (Falguieres et al., 2014). Hay pocos casos descritos de mutaciones en el gen *ABCB4* que suponen alteraciones drásticas en la proteína (delecciones, cambios de fase de lectura, alteraciones del *splicing*, generación de un codón de parada prematuro). La mayor parte de las mutaciones identificadas son *missense*, que conllevan una substitución de un aminoácido en la proteína. En niños con CIFP-3, la combinación del análisis genético y el estudio inmunohistoquímico de la biopsia hepática ha mostrado que mutaciones en ambos alelos de *ABCB4* (en homocigosis o en heterocigosis compuesta) que asocian con la ausencia de la proteína en la membrana canalicular del hepatocito dan lugar a enfermedad hepática grave, refractaria al tratamiento farmacológico, que hace necesaria la realización de un trasplante de órgano. En los niños cuya biopsia hepática refleja expresión normal de MDR3 en membrana canalicular, se asume que las correspondientes mutaciones afectan a la actividad traslocadora de fosfatidilcolina. Algunos de estos niños requieren trasplante hepático; otros responden al tratamiento con AUDC. Para explicar este fenómeno, se ha hipotetizado que algunas de las mutaciones *missense* en *ABCB4* anulan por completo la funcionalidad de MDR3, mientras que otras permiten una actividad residual traslocadora de fosfatidilcolina. En apoyo de esta hipótesis, una única mutación en heterocigosis ha sido detectada en la mayoría de individuos adultos con trastornos colestásicos de menor gravedad asociados a deficiencia en MDR3. En la Figura 4 se esquematiza la hipótesis más

extendida del desarrollo de enfermedades hepatobiliares en relación al impacto de mutaciones en *ABCB4*.



**Figura 4:** Hipótesis del desarrollo de enfermedad hepatobiliar en relación al grado de funcionalidad de MDR3. Basada en el fenotipo de pacientes en los que se han identificado mutaciones en *ABCB4*.

## 5. Potenciales abordajes terapéuticos para la deficiencia en MDR3

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la capacidad de determinados compuestos para revertir el efecto de mutaciones específicas, y su posible uso clínico en enfermedades hepáticas asociadas a defectos en transportadores biliares (Jacquemin, 2012). Alguno de ellos ha sido recientemente ensayado en un reducido número de pacientes con mutaciones específicas en los genes asociados a C1FP-1 y C1FP-2 (Gonzales et al., 2012; Hasegawa et al., 2014; Naoi et al., 2014). En la Figura 5 se muestran las estrategias

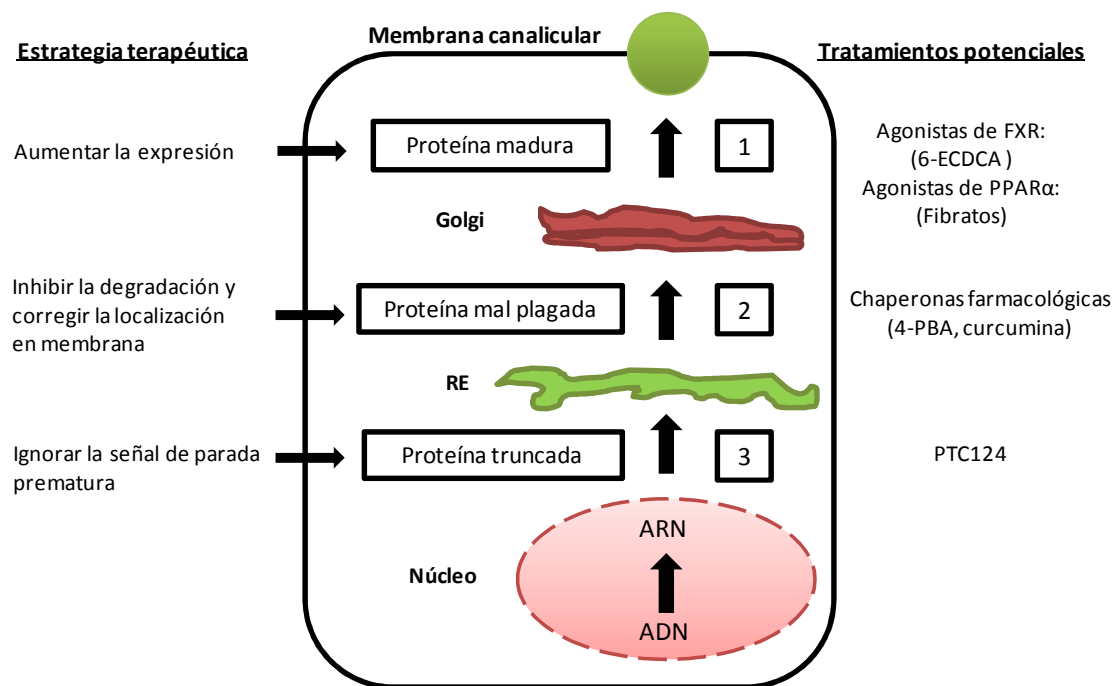


contempladas según el tipo de mutación y compuestos con potencial terapéutico para cada caso.

El candidato más prometedor para el tratamiento de enfermedades genéticas asociadas a mutaciones *nonsense*, que dan lugar a proteínas truncadas, es el compuesto PTC124 (Ataluren®; 3-[5-(2-fluorophenyl)-[1,2,4] oxa-diazol-3-yl]-benzoic acid). Esta molécula confiere al ribosoma la facultad de ignorar ciertos codones de terminación prematuros, permitiendo la síntesis de una proteína completa y funcional (Welch *et al.*, 2007). Su potencial terapéutico se ha demostrado en pacientes que portan mutaciones *nonsense* en el gen CFTR, que codifica un canal de cloro y cuya disfunción causa fibrosis quística (Kerem *et al.*, 2008). Algunos antibióticos aminoglicósidos tienen un efecto similar (Karijovich, Yu, 2014), pero su utilización de forma crónica es cuestionable.

Algunas mutaciones que afectan al correcto plegamiento de la proteína son susceptibles de ser rescatadas con chaperonas químicas (Morello *et al.*, 2000; Powers *et al.*, 2009; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2004; Welch, 2004). El 4-fenilbutirato (4-PBA) y la curcumina son dos moléculas aprobadas para uso clínico, que manifiestan propiedades de chaperona. Aunque sus mecanismos de acción son diferentes, estudios *in vitro* han demostrado que pueden restituir la expresión en membrana de varias proteínas cuya mutación produce enfermedad hepática. El 4-fenilbutirato, que favorece el plegamiento por aumentar la expresión de proteínas de choque térmico (Rubenstein, Zeitlin, 2000), restituye la localización en membrana de mutantes específicos de ATP7B (enfermedad de Wilson) (van den Berghe *et al.*, 2009), ATP8B1 (C1FP-1) (van der Velden *et al.*, 2010), BSEP (C1FP-2) (Hayashi, Sugiyama, 2007) y CFTR (fibrosis quística) (Rubenstein, Zeitlin, 1998). La curcumina, un inhibidor de la Ca<sup>+</sup>-ATPasa de retículo endoplasmico, es capaz de restaurar *in vitro* defectos de plegamiento de mutantes de ATP7B (van den Berghe *et al.*, 2009) y CFTR (Norez *et al.*, 2006).

Finalmente, para mutaciones que conllevan una reducción en la expresión de la proteína, se considera la utilización de compuestos que incrementen la misma. Este es el caso de agonistas de receptores nucleares, que conducen a su activación y consiguiente aumento en la expresión de sus genes diana. Actualmente están en desarrollo ensayos clínicos con el ácido 6-etil quenodeoxicólico (6-ECDCA; obeticólico®) (Mudaliar *et al.*, 2013; Silveira, Lindor, 2014), un agonista del factor FXR que induce la expresión de genes implicados en la homeostasis biliar, entre ellos, *ABCB4* (Zollner, Trauner, 2009).



**Figura 5: Posibles abordajes terapéuticos en enfermedades asociadas a defectos en transportadores biliares según el tipo de mutación.** 1. Mutación *missense* que no compromete la localización normal de la proteína en membrana canalicular, pero reduce de su expresión; 2. Mutación *missense* que produce un defecto en el plegamiento de la proteína y su retención en retículo endoplásmico (RE); 3. Mutación *nonsense* que da lugar a una proteína truncada. Figura adaptada de Jacquemin E. (Jacquemin, 2012).

## **Objetivos**



Los objetivos propuestos para esta tesis doctoral se resumen en:

1. Examinar la presencia de mutaciones en *ABCB4* en una cohorte de niños con colestasis crónica y sospecha clínica de deficiencia de MDR3.
2. Caracterizar *in vitro* las mutaciones identificadas, mediante el análisis de la expresión, localización subcelular y actividad traslocadora de fosfatidilcolina de MDR3, y correlacionar los datos resultantes con el fenotipo clínico de los pacientes.
3. Evaluar si el tratamiento con chaperonas farmacológicas es capaz de revertir el efecto de mutaciones que afectan al correcto plegamiento de la proteína y provocan su retención en el retículo endoplásmico.



## **Materiales y Métodos**





## 1. Muestras biológicas

Se utilizaron dos tipos de muestras de pacientes con clínica sugerente de deficiencia en MDR3: sangre y tejido hepático procedente de trasplantes del órgano o de biopsias percutáneas. En todos los casos, la extracción de sangre y la realización de biopsia hepática habían sido indicadas con fines diagnósticos.

La utilización de las muestras se hizo con el consentimiento escrito de los pacientes o sus padres/tutores/representantes legales en el caso de los menores, según determina la legislación vigente.

## 2. Análisis genético de pacientes

### 2.1 Secuenciación de ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de 2 ml de sangre periférica, utilizando el sistema *PureGene Blood Core kit* (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. Los 27 exones codificantes de *ABCB4* junto con, al menos, 50 pb de las secuencias intrónicas adyacentes se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de PCR fueron purificados con *ExoSAP-IT*® (Affymetrix) según las indicaciones del fabricante. La secuenciación bidireccional de cada fragmento se realizó en un volumen final de 10 µl con 0,5 µl de BigDye® Terminator v 3.1 (Applied Biosystems), 0,5 µl de oligonucleótido a 100 ng/µl y 100 ng de ADN. Las condiciones de PCR en las reacciones de secuenciación consistieron en: 10 min-95°C; 25 ciclos (20 s-94°C, 15 s-55°C, 4 min-60°C); 5 min-72°C. Las muestras se precipitaron con etanol 100% frío y acetato sódico 3M pH 5,5 durante 30 min a -20°C, se centrifugaron y se lavaron con etanol 75% frío. Las secuencias fueron procesadas en un secuenciador ABI PRISM™ 3100 de Applied Biosystems.

El grado en que algunas mutaciones presumiblemente afectan al *splicing* fue estimado utilizando el programa *Human Splicing Finder software* (Desmet et al., 2009).

## 2.2 Amplificación múltiple dependiente de ligasa

La presencia de microdelecciones o duplicaciones de exones en el gen MDR3 se analizó mediante la técnica de amplificación múltiple dependiente de ligasa (MLPA) usando un kit comercial (SALSA P109; *MRC-Holland*). En él se incluyen sondas para los 27 exones codificantes y 12 sondas control. La información relativa a las secuencias de las sondas y los sitios de ligación está disponible en la dirección <http://www.mlpa.com>. El ensayo de MLPA se llevó a cabo acorde a las instrucciones del fabricante, utilizando 100 ng de ADN. El análisis de los datos se realizó con el programa MRC-Coffalyser versión 2 de MRC-Holland (Amsterdam, NL). El valor de la señal obtenida para cada exón en las muestras de ADN de los pacientes se normalizó utilizando ADN control de tres individuos sanos.

## 3. Inmunohistoquímica

Los ensayos de inmunohistoquímica se llevaron a cabo en secciones de 4 µm de tejido hepático embebido en parafina, utilizando el método de desenmascaramiento de antígeno por calor.

Las secciones se trataron con 0.3% peróxido de hidrógeno durante 30 minutos, para reducir la actividad peroxidasa endógena. Posteriormente, se autoclavaron a 121°C durante 3 minutos en buffer citrato 0.1M (pH 6.0). Las secciones se incubaron 16-18 horas a 4°C con anticuerpos primarios monoclonales anti-BSEP (*Santa Cruz*) y anti-MDR3 (*clon P<sub>3</sub>II-26 Millipore*) a una dilución 1:20. El marcaje de BSEP se utilizó como control de la preservación de antígenos en el tejido. Después de 2 lavados con solución Tris-base salino (TBS), las secciones se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (dilución 1:200), se trataron 10 minutos con el sustrato DAB (*Dako*) y se contratiñeron con hematoxilina. Secciones de hígado normal fueron procesadas en paralelo como control para comparar la intensidad de la señal. La tinción de MDR3 en las muestras de pacientes se clasificó como normal, débil o ausente.

## 4. Obtención de mutantes de MDR3

Para la generación de los mutantes de MDR3 se utilizaron los plásmidos pReceiver-M02-MDR3 (*Capital Biosciences*), que contiene la secuencia codificante de *ABCB4*, y pEZ-M29-MDR3 (*Capital Biosciences*), que posee el *ABCB4* fusionado al extremo aminoterminal de la

proteína verde fluorescente (GFP). Las mutaciones identificadas en los pacientes fueron incorporadas mediante el sistema *QuikChange Site-Direct Mutagénesis Kit* (Stratagene). Los oligonucleótidos mutagénicos utilizados se detallan en la Tabla 1. En todos los casos se verificó por secuenciación la incorporación de la mutación y la integridad de la secuencia completa de *ABCB4* y de las regiones plasmídicas adyacentes.

**Tabla 1: Oligonucleótidos mutagénicos utilizados para generar los mutantes de MDR3. El nucleótido cambiado se señala en negrita.**

Mutante	Oligonucleótido diseñado 5' → 3'
R47Q	CATTGTTT <b>CA</b> ATACTCCGATTGGC
G68R	CATAGCTCAC <b>AG</b> ATCAGGTC
T82N	GGAGAGATGA <b>AT</b> GACAAATTTG
T175A	CTGAACTCAAT <b>G</b> CGCGGCTAAC
T201M	GCAGTAGCCATGTTTTTTGCAGG
G228R	GCCCTATTCTA <b>C</b> GA CTCTCTGC
A250T	GAAGTAGCTGCTTATA <b>CA</b> AAAAGCAGGCGCCGTG
S320F	CTGGTATGGATTCACTCTAGTC
P352L	CCAGGCTGCCCTATGTATTGATGC
D459H	GATGGGCAG <b>C</b> ATATTAGGAACT
P479L	GAGTCAGGAGCTGGTGCTGTTTT
A934T	CTGTGCAGAAG <b>AC</b> ACACATCTATGG
S978P	CTGGTGTTTCCTGCAATTG
E1118K	CGTGTCTCAGA <b>A</b> GCCTATCC

## 5. Cultivo celular

El análisis de la localización subcelular de los mutantes de MDR3 se llevó a cabo en la línea celular MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*)-II (ATCC, LGC Standards). Éstas son células polarizadas y de utilización habitual en los estudios del tráfico intracelular de proteínas de membrana.

Para evaluar la expresión y actividad de MDR3 se utilizaron células embrionarias de riñón humano AD-293 (*Agilent Technologies*), que derivan de las HEK293 y poseen una mayor adhesión al sustrato. Esta línea celular presenta una elevada eficiencia de transfección.

Ambos tipos celulares se cultivaron a 37°C y una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Lonza*) suplementado con suero fetal bovino (FBS, *Gibco*) al 10%, 2mM de glutamina (*Gibco*) y 1% penicilina/estreptomicina.

## 6. Transfección transitoria en células MDCK-II y AD293

Los ensayos de transfección transitoria en células MDCK-II y AD-293 se llevaron a cabo utilizando los reactivos (*Invitrogen*) y *jetPRIME*® (*Polyplus transfection*), respectivamente. Esta diferencia en el uso de reactivos de transfección se debe a la alta mortalidad observada en las células AD-293 tras la adición de *LipofectAMINE 2000 Reagent*.

Las células se incubaron en distintos soportes y a distinta confluencia según el experimento y tipo celular. Después de 24 horas, se añadió la mezcla de complejos lípido-ADN, preparada como se detalla en la Tabla 2.

**Tabla 2: Condiciones de transfección en células MDCK-II (parte superior) y AD-293 (parte inferior).**

Placa	Plásmido (µg)	OptiMEM (µl)	Lipofectamina 2000 (µl)	Medio (µl)
p24	0.8	100	2	500
p6	4	500	10	2000

Placa	Plásmido (µg)	<i>jetPRIME</i> ® Buffer (µl)	<i>jetPRIME</i> ® reagent (µl)	Medio (µl)
P24	0.25	50	0.5	500
p6	1	200	2	2000

Los experimentos correspondientes se iniciaron 48 horas después de la adición de la muestra de transfección.

## 7. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para el marcaje por inmunofluorescencia, las células se sembraron en cubreobjetos de cristal de 12mm de diámetro y se mantuvieron durante 24 horas antes de proceder a la transfección. 48 horas después de la transfección, se fijaron con una solución de 2% paraformaldehído durante 15 minutos, y se permeabilizaron con 0.075% saponina en una solución bloqueante (10% suero fetal bovino preparado en PBS) durante 40 minutos. Tras la permeabilización y bloqueo, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal anti-MDR3 humano (dilución 1:100) y con el anticuerpo policlonal de conejo anti-calnexina (1:500, *StressMarq*) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con solución de tampón salino (PBS) y se incubaron 60 minutos con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado AlexaFluor594 y anti-conejo conjugado AlexaFluor488 (1:200; *Invitrogen*). Finalmente, los cubreobjetos con las células inmunoteñidas se lavaron, secaron y montaron en portaobjetos de vidrio, usando *Vectashield*<sup>®</sup> (*Vector Laboratories Inc.*) como medio de montaje.

Para la detección de la fluorescencia se utilizó un microscopio confocal TCS SPII (*Leica Microsystems*) empleando un objetivo 63x/1.3NA. Todas las imágenes fueron obtenidas como secuencias ópticas (~ 0.4 µm). Para la visualización de dos fluoróforos en la misma muestra, ambos fueron excitados secuencialmente (no simultáneamente) para evitar interferencias entre canales.

## 8. Electroforésis de proteínas e inmunotransferencia

Las células AD293 fueron lisadas en PBS frío con 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS y 1% coctel inhibidor de proteasas (*Roche Applied Science*). La concentración de proteínas fue determinada por el método Bradford. Los lisados celulares se separaron en geles de 6% poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF durante 60 minutos a 200mA. A continuación, las membranas se mantuvieron en solución de bloqueo (5% leche desnatada en PBS-0,1% Tween 20) durante 60 minutos a temperatura ambiente, e incubaron a 4°C durante 16-18 horas con el anticuerpo primario. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con tampón de lavado (0.1% Tween 20 en PBS) 3 veces durante 10 minutos, e incubadas 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa F(ab')<sub>2</sub> (*DakoCytomation*). Finalmente, las membranas fueron lavadas 3 veces en

tampón de lavado e incubadas durante 5 minutos en *ECL Advanced Western Blotting Detection Kit* (GE Healthcare) para la inmunodetección por quimioluminiscencia.

La señal de las bandas fue cuantificada utilizando el programa *Quantity One® 1-D analysis software*.

## 9. Extracción de ARN

La extracción y purificación del ARN total se llevó a cabo con *RNeasy® Micro kit* (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para eliminar la contaminación con ADN genómico, las muestras se trataron con 2 U de *DNase* (Ambion) durante 30 minutos a 37°C. La enzima se inactivó mediante incubación con *DNase Inactivator Reagent* (Ambion) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La concentración y pureza del ARN total se determinó empleando el espectofotómetro Nanodrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*). La integridad del ARN se comprobó visualizando los ARN ribosomales 28S y 18S, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

## 10. Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real

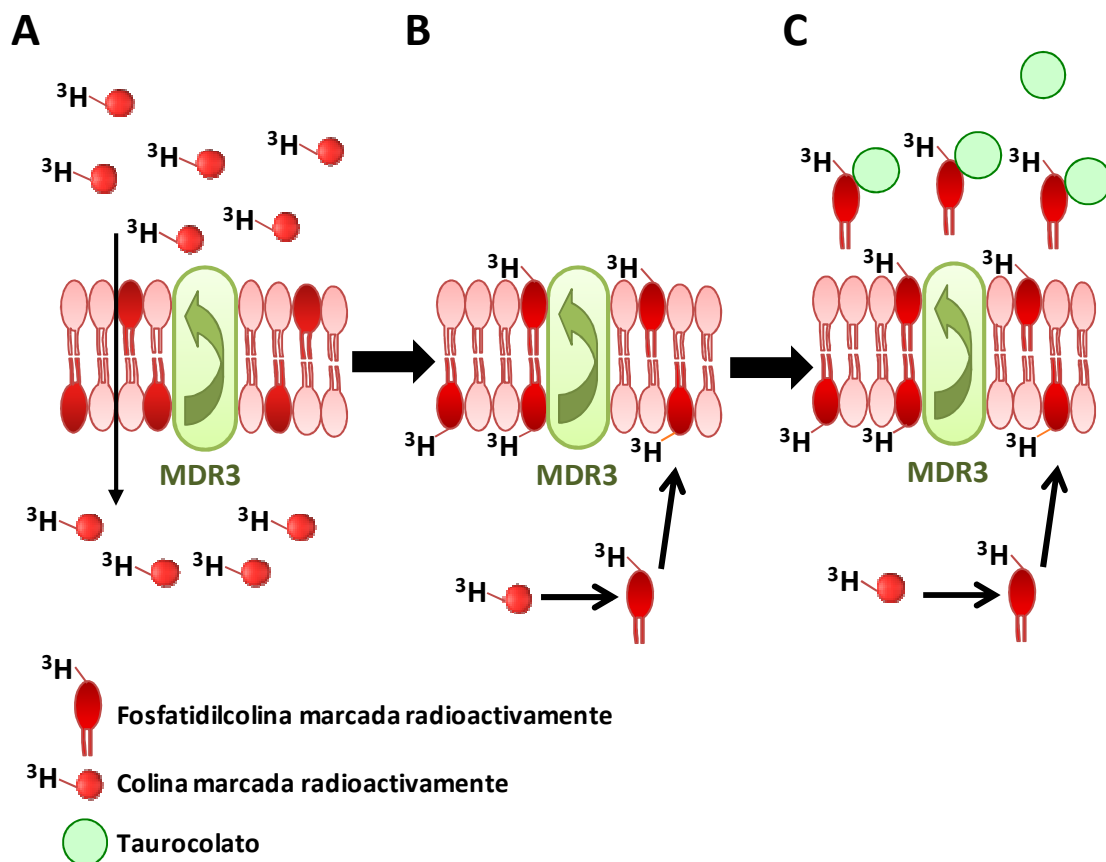
Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se utilizaron 0.5 µg de ARN y los reactivos y protocolo del *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (Roche Applied Science). La PCR cuantitativa a tiempo real se llevó a cabo con el sistema *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Applied Science) y un detector LightCycler. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Los valores de expresión cuantitativos fueron extrapolados de curvas estándar realizadas por separado y normalizados con  $\beta$ -actina. Los oligonucleótidos usados fueron los siguientes (la longitud esperada de los productos amplificados se muestran entre paréntesis): *ABCB4*, 5'-CTGTGCAGAAGGCACACATC-3' y 5'-GGCTGCAGACAGCTTAGCTT-3' (227 pb);

$\beta$ -actina, 5'-GAGCGGGAAATCGTGC GTGACATT-3' y 5'-GAAGGTAGTTTCGTGGATGCC-3' (210 pb).

## 11. Determinación de la actividad flopasa de MDR3

La determinación de la actividad traslocadora de PC de MDR3 se llevó a cabo en células AD-293. La estrategia utilizada se esquematiza en la Figura 6.

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $0.5 \times 10^6$  células/pocillo, y 24 horas después se transfectaron con  $1\mu\text{g}$  de los plásmidos que portaban las versiones silvestres y mutadas de MDR3. 48 horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con medio esencial mínimo bajo en colina (EMEM; *Sigma*) y se mantuvieron en este mismo medio durante 60 minutos para disminuir los niveles de colina intracelular. A continuación, las células se incubaron en EMEM con  $2\mu\text{Ci/ml}$  de  $[^3\text{H}]$ -Colina (*Perkin Elmer*) durante 3 horas. Posteriormente, lavaron 3 veces con EMEM para eliminar la  $[^3\text{H}]$ -Colina del medio e incubaron otras 3 horas en presencia o ausencia de taurocolato sódico 1mM. Durante este tiempo se recogieron fracciones de  $50\mu\text{L}$  de sobrenadante cada 30 minutos. La radiactividad contenida en las fracciones se midieron en un contador de centelleo líquido 1450 MicroBeta TriLux (*Perkin Elmer*).



**Figura 6: Abordaje experimental utilizado para evaluar la actividad flopasa de PC de MDR3.** A, la [ $^3\text{H}$ ]-colina añadida al medio de cultivo es incorporada al interior celular. B, en el citoplasma, la [ $^3\text{H}$ ]-colina es mayoritariamente convertida a [ $^3\text{H}$ ]-fosfatidilcolina ([ $^3\text{H}$ ]-PC) a través de la ruta de la CDP-colina (Li *et al.*, 2005). La fracción de la [ $^3\text{H}$ ]-PC que se integra en la cara interna de la membrana plasmática es transportada a la cara externa en presencia de MDR3. C, las sales biliares, dadas sus propiedades detergentes, son capaces de secuestrar y extraer al medio de cultivo las moléculas de [ $^3\text{H}$ ]-PC presentes en la superficie externa de la membrana plasmática. La diferencia de radioactividad liberada al medio de cultivo en presencia y ausencia de la sal biliar representa una medida del grado de actividad de MDR3.

## 12. Análisis estadístico

Para la expresión de los resultados se calculó la media y la desviación estándar de la media (SD).

Para calcular la significación estadística de la comparación entre dos medias se utilizó el test de la t de Student.



## **Resultados**



## 1. Identificación de defectos de MDR3 en niños con enfermedad colestática

En los últimos 10 años, nuestro grupo ha estudiado un posible defecto de MDR3 en 67 niños con colestasis crónica de etiología desconocida y niveles elevados de GGT en suero. El análisis de 31 de estos pacientes se ha llevado a cabo durante la realización de esta Tesis. La figura 7 muestra un esquema de la estrategia combinada utilizada para detectar la deficiencia de MDR3. A todos los pacientes se les realizó el análisis mutacional del gen *ABCB4* mediante secuenciación directa de los 27 exones codificantes. En aquellos casos en que no se detectaron mutaciones puntuales o se evidenció una única mutación en heterocigosis, se analizó la posible presencia de deleciones o duplicaciones de exones mediante la técnica MLPA. Además, en los casos en que se dispuso de biopsia hepática (33 pacientes) se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica para evaluar la expresión canalicular de la proteína MDR3.

Se identificaron alteraciones en *ABCB4* en 16 pacientes. Seis niños portaban mutaciones en ambos alelos (homocigosis o heterocigosis compuesta) y 10 en un único alelo (Tabla 3). Respecto al tipo de mutaciones identificadas, 14 suponen un cambio de aminoácido (mutaciones *missense*); dos conllevan la introducción de un codón de parada prematuro (mutaciones *nonsense*); una previsiblemente da lugar a una alteración de *splicing*; y otra consiste en una inserción que da lugar a un cambio en el marco de lectura a partir del aminoácido 1242. En ningún caso se detectaron deleciones o duplicaciones de exones.

Los análisis inmunohistoquímicos se llevaron a cabo con anterioridad a los estudios genéticos, acorde a la disponibilidad de biopsia hepática de los respectivos pacientes. Los marcajes se realizaron con anticuerpos monoclonales anti-MDR3 y anti-BSEP, el transportador canalicular de sales biliares, utilizado como control positivo de tinción canalicular. Los resultados se clasificaron como expresión normal de MDR3, débil o ausente, según comparación con la tinción canalicular obtenida en muestras de hígado sano marcadas en paralelo. De los 33 casos analizados por inmunohistoquímica, en 25 no se detectaron mutaciones en *ABCB4*. Todos ellos presentaron una tinción canalicular normal de MDR3. Respecto a los 8 niños con mutaciones en *ABCB4*, tres presentaron expresión normal de MDR3; en otros tres casos se apreció una tinción débil y en dos niños se evidenció ausencia de expresión canalicular de la proteína (Tabla 3). La figura 8 recoge una imagen representativa de cada caso. En la imagen A se aprecia el patrón canalicular de tinción de MDR3 en una muestra de tejido hepático sano. La imagen B corresponde a la biopsia del paciente 9, heterocigoto

compuesto para las mutaciones T201M y E1118K, en la que se evidencia una tinción canalicular normal, semejante al control. El paciente 8, heterocigoto compuesto para D459H y P479L, mostró expresión débil de MDR3 (imagen C; las flechas señalan zonas de marcaje canalicular). Por último, en el paciente 5, homocigoto para G68R no se detectó tinción canalicular frente a MDR3 (imagen D).

Las características clínicas de los 16 pacientes con mutaciones en *ABCB4* se muestran en la tabla 4.

En todos ellos, la presentación de la enfermedad se caracterizó por prurito, ictericia y niveles elevados GGT. No obstante, la edad de inicio de los síntomas fue variable (0.5-10 años). En una mayoría de casos, la histología reveló un patrón de proliferación ductal. Todos recibieron tratamiento con ácido ursodeoxicólico (AUDC; 15-30 mg/kg/día). Sin embargo, tanto la respuesta a este tratamiento como la progresión de la enfermedad difirieron según el paciente. Cinco de los niños experimentaron enfermedad hepática progresiva refractaria a la terapia con AUDC y precisaron de trasplante hepático.

Estas diferencias respecto a la gravedad de la enfermedad hepática y respuesta al tratamiento farmacológico se han descrito también en otras series de niños con CIFP-3 (Colombo et al., 2011), y se ha propuesto que obedecen al distinto impacto de cada mutación sobre la expresión y/o funcionalidad de MDR3 (Falguieres et al., 2014). En este estudio nos planteamos caracterizar funcionalmente las mutaciones identificadas en nuestros pacientes y correlacionar los resultados con los datos clínicos. El análisis se ciñó a las 14 mutaciones *missense*, dado que la inserción y las mutaciones que suponen la introducción de un codón de parada prematuro o alteran el correcto *splicing* presumiblemente tienen un efecto dramático sobre la estructura/función de la proteína.

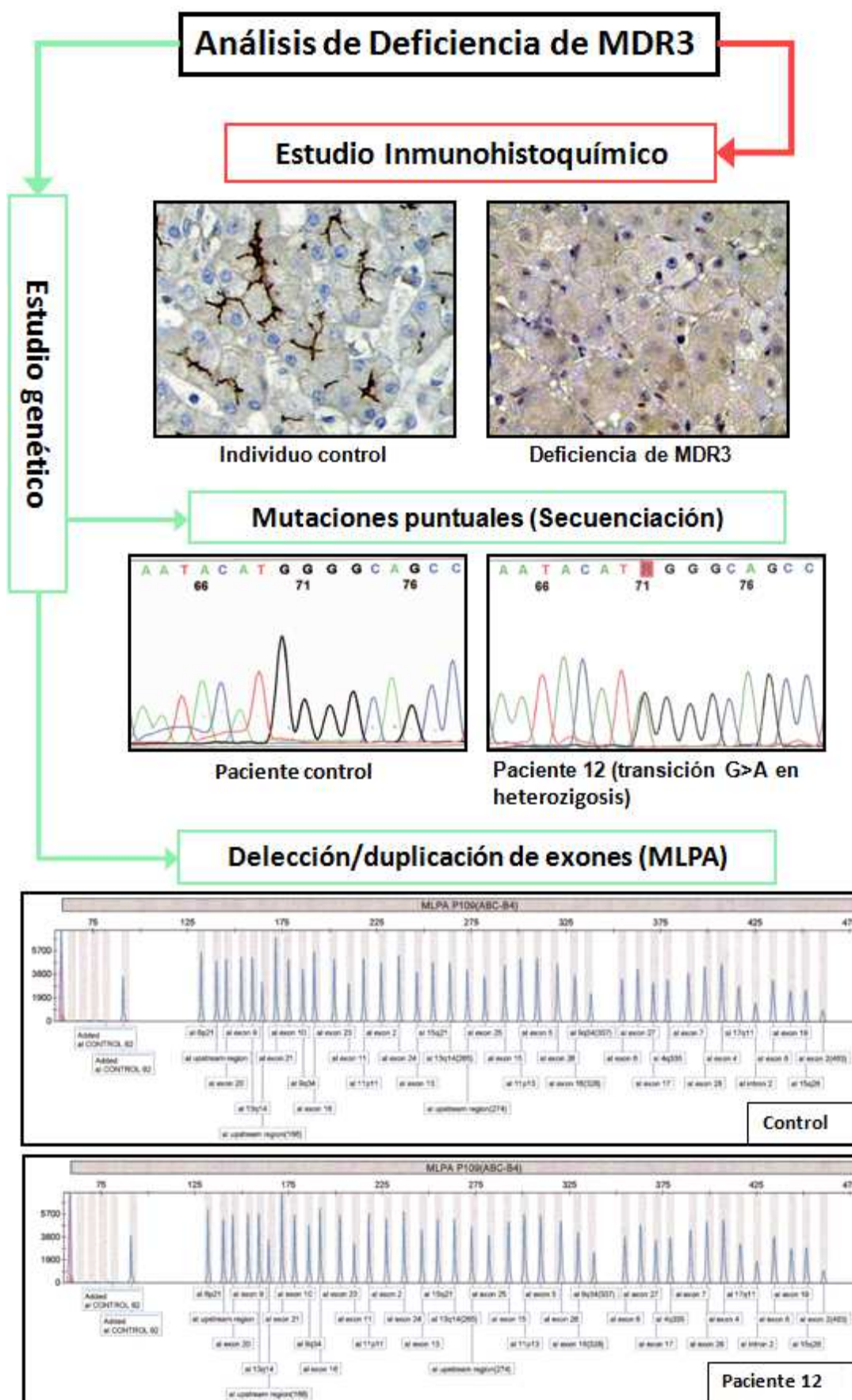
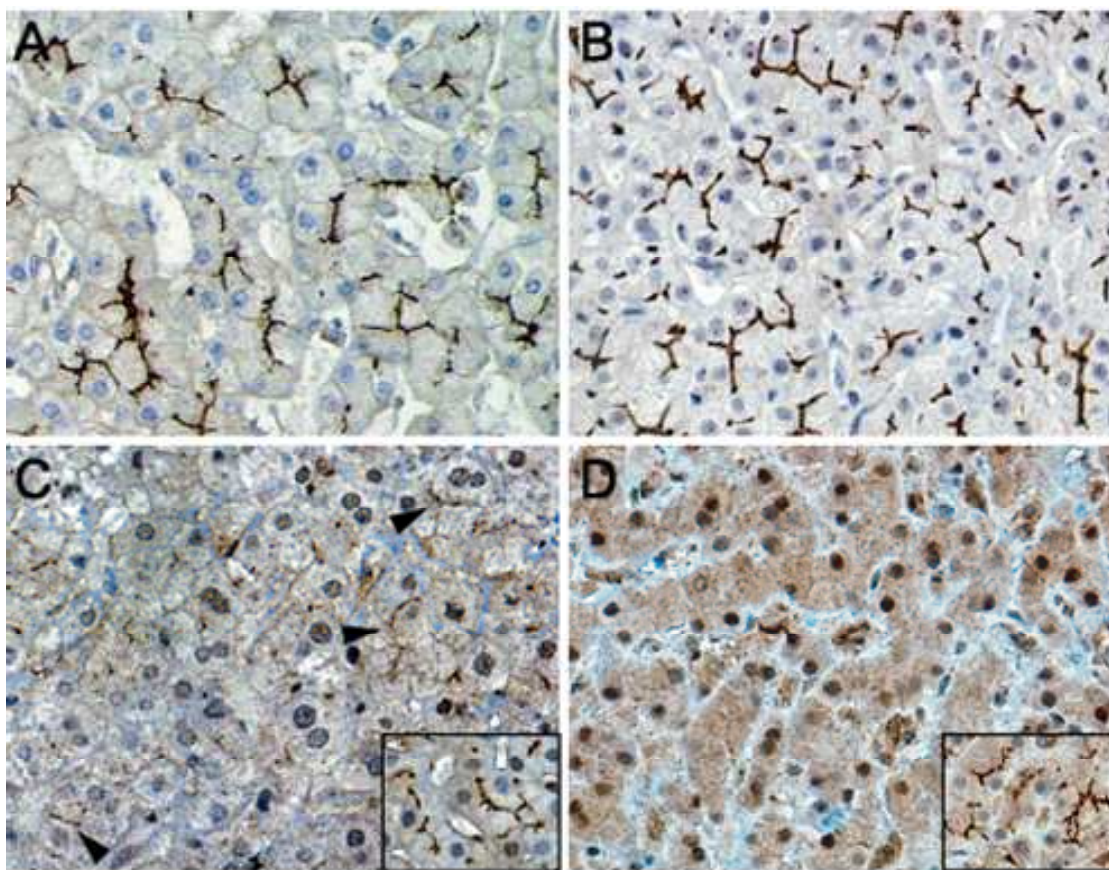


Figura 7: Esquema de la estrategia utilizada para la detección de deficiencia en MDR3.

Tabla 3. Mutaciones en el gen *ABCB4* y expresión canalicular de MDR3.

Paciente	Alelo 1		Alelo 2		Tinción MDR3
	Mutación	Efecto	Mutación	Efecto	
1	c.3559 C>T	p.R1187X	c.3633 +2 T>A	Defecto de splicing	AUSENTE
2	c.3725_3726 insA	p.I1242Nfs	ND		*
3	c.3725_3726 insA	p.I1242Nfs	ND		*
4	c.430 C>T	p.R144X	ND		*
5	c.202 G>A	p.G68R	c.202 G>A	p.G68R	AUSENTE
6	c.202 G>A	p.G68R	c.202 G>A	p.G68R	*
7	c.140 G>A	p.R47Q	c.245 C>A	p.T82N	DÉBIL
8	c.1375 G>C	p.D459H	c.1436 C>T	p.P479L	DÉBIL
9	c.602 C>T	p.T201M	c.3352 G>A	p.E1118K	NORMAL
10	c.523 A>G	p.T175A	ND		*
11	c.682 G>C	p.G228R	ND		*
12	c.748 G>A	p.A250T	ND		*
13	c.959 C>T	p.S320F	ND		*
14	c.1055 C>T	p.P352L	ND		NORMAL
15	c.2800 G>A	p.A934T	ND		DÉBIL
16	c.2932 T>C	p.S978P	ND		NORMAL

ND, no detectado. \* No se realizó biopsia hepática.



**Figura 8. Análisis por inmunohistoquímica de la expresión de MDR3 en secciones hepáticas de pacientes representativos.** A. Tinción canalicular de MDR3 en hígado normal. B. Tinción normal en el paciente 9 que porta dos mutaciones *missense*. C. Tinción canalicular débil en el paciente 8 que porta dos mutaciones *missense*. D. Ausencia de tinción para MDR3 en el paciente 5, que porta una mutación en homocigosis. Los recuadros en C y D muestran el marcaje con el anticuerpo BSEP, usado como control de la integridad de antígenos canaliculares.(400x.)

Tabla 4. Pacientes con mutaciones en *ABCB4* y características clínicas.

Paciente/ Género	Historia familiar	Enfermedad asociada a hígado	Edad primeros síntomas	Estado actual
1/F	No	Ninguna	1.5 años	Trasplante hepático a los 5 años
2/F	Hermana de la paciente 3	Ninguna	1 año	14 años; responde al tratamiento con AUDC
3/F	Hermana de la paciente 2	Ninguna	1 año	7 años; responde al tratamiento con AUDC
4/M	No	Homocigoto para la variante p.V444A de ABCB11 (BSEP)	5 años	8 años; responde al tratamiento con AUDC
5/F	Hermana de la paciente 6	Ninguna	1.6 años	Trasplante hepático a los 6.5 años
6/F	Hermana de la paciente 5	Ninguna	1.8 años	Trasplante hepático a los 7 años
7/M	Hermano fallecido por varices esofágicas sangrantes	Ninguna	23 años	33 años; responde al tratamiento con AUDC
8/F	No	Ninguna	3.5 años	Trasplante hepático a los 9 años
9/M	No	Ninguna	0.9 años	15 años; responde al tratamiento con AUDC
10/F	No	A1AT (genotipo SZ)	0.2 años	20 años; responde al tratamiento con AUDC
11/M	Padre con litiasis, hermana con enfermedad hepática similar	Ninguna	9 años	Trasplante hepático a los 14 años
12/M	Desconocida	Hiperbilirrubinemia	13 años	17 años; responde al tratamiento con AUDC
13/F	Padre con litiasis	Síndrome Noonan	2 años	19 años; responde al tratamiento con AUDC
14/F	Padres consanguíneos, madre con ICP.	Atresia biliar	0.2 años	Trasplante hepático a los 14 meses
15/F	No	Ninguna	11 años	20 años; lista de espera trasplante hepático
16/F	No	Ninguna	8.5 años	13 años; responde al tratamiento con AUDC

A1AT, deficiencia Alfa 1 antitripsina; AUDC, ácido deoxicólico; F, femenino; M, masculino



## 2. Estudio del efecto de mutaciones en MDR3

### 2.1. Generación de mutantes

Para determinar el efecto de las 14 mutaciones *missense* de *ABCB4*, se generaron los correspondientes ADNc mutados mediante mutagénesis dirigida, utilizando el plásmido pReceiver-M02-MDR3. Dos de las mutaciones (G68R y T201M) se introdujeron también en el plásmido pEZ-M29-MDR3, que porta la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) acoplada al extremo carboxi-terminal de MDR3. En todos los casos, la incorporación de la mutación y la integridad del resto de la secuencia de MDR3 se verificó por secuenciación. Para el análisis de los mutantes se utilizaron dos líneas celulares carentes de MDR3: MDCK-II y AD-293.

### 2.2. Estudio de localización subcelular

El efecto de las mutaciones de *ABCB4* sobre la localización subcelular de la proteína se analizó en células MDCK-II, que son polarizadas y se utilizan de forma habitual en el estudio del tráfico intracelular de proteínas. Las células se transfectaron de forma transitoria con los plásmidos que contenían los ADNc salvaje y mutados de *ABCB4*, y se marcaron por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-MDR3 y anti-calnexina, un marcador de retículo endoplásmico. En la figura 9 se muestra el análisis por microscopía confocal de las células transfectadas con el ADNc salvaje de *ABCB4*. Como se aprecia en la imagen del eje ortogonal (panel inferior), la proteína MDR3 salvaje (marcada en rojo) se localizó predominantemente en la membrana apical.

Diez de los mutantes analizados (R47Q, T82N, T175A, T201M, A250T, S320F, P352L, P479L, S978P, y E1118K) presentaron el mismo patrón de localización que la proteína MDR3 salvaje en la membrana apical de las células MDCK-II (Figura 10). Por tanto, estas mutaciones no afectan a la correcta localización celular de la proteína.

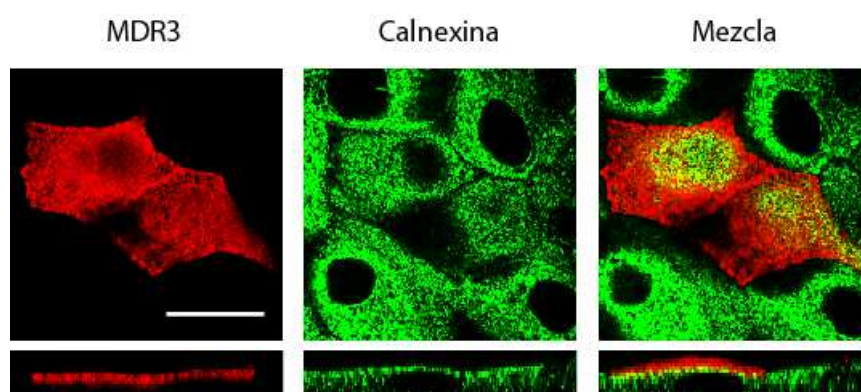
Las restantes mutaciones *missense* (G68R, G228R, D459H y A934T) produjeron la acumulación intracelular de la proteína, con ausencia total de expresión en la membrana apical (Figura 11). Ensayos de colocalización con el marcador calnexina evidenciaron la retención de estos cuatro mutantes de MDR3 predominantemente en retículo endoplásmico.

Esta colocalización se detectó en amarillo con la superposición de ambos marcajes (MDR3 en rojo y calnexina en verde).

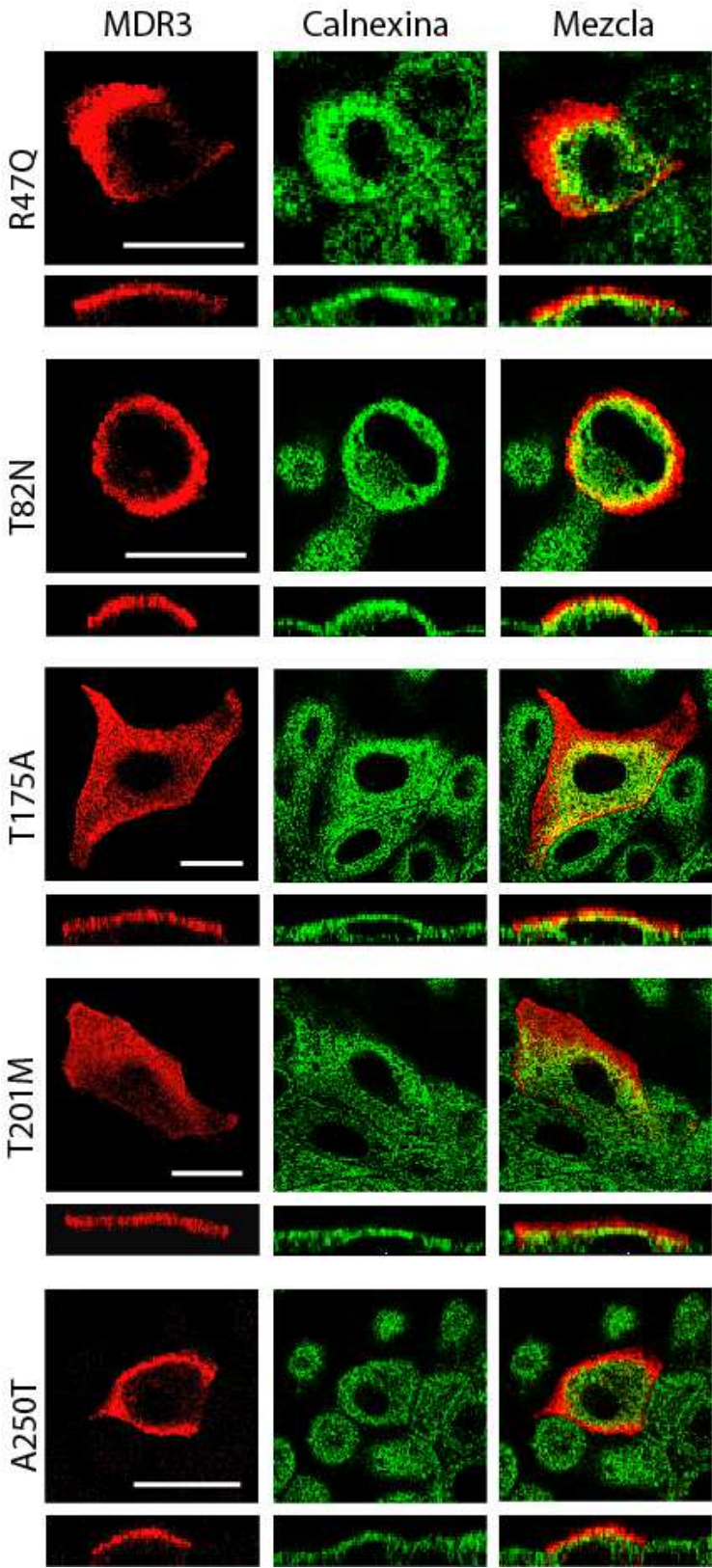
Para confirmar el patrón de localización subcelular obtenido en los ensayos de inmunofluorescencia, se transfectaron células MDCK-II con plásmidos portando ADNc de MDR3 salvaje y mutada fusionados a la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 12). En las células que expresaban la proteína MDR3 salvaje, la fluorescencia se localizó en la membrana apical. El mismo patrón se observó en las células transfectadas con el mutante T201M, mientras que la mutación G68R produjo la retención intracelular de MDR3 (Figura 6). Estos ensayos concuerdan con los resultados obtenidos mediante la utilización del anticuerpo anti-MDR3.

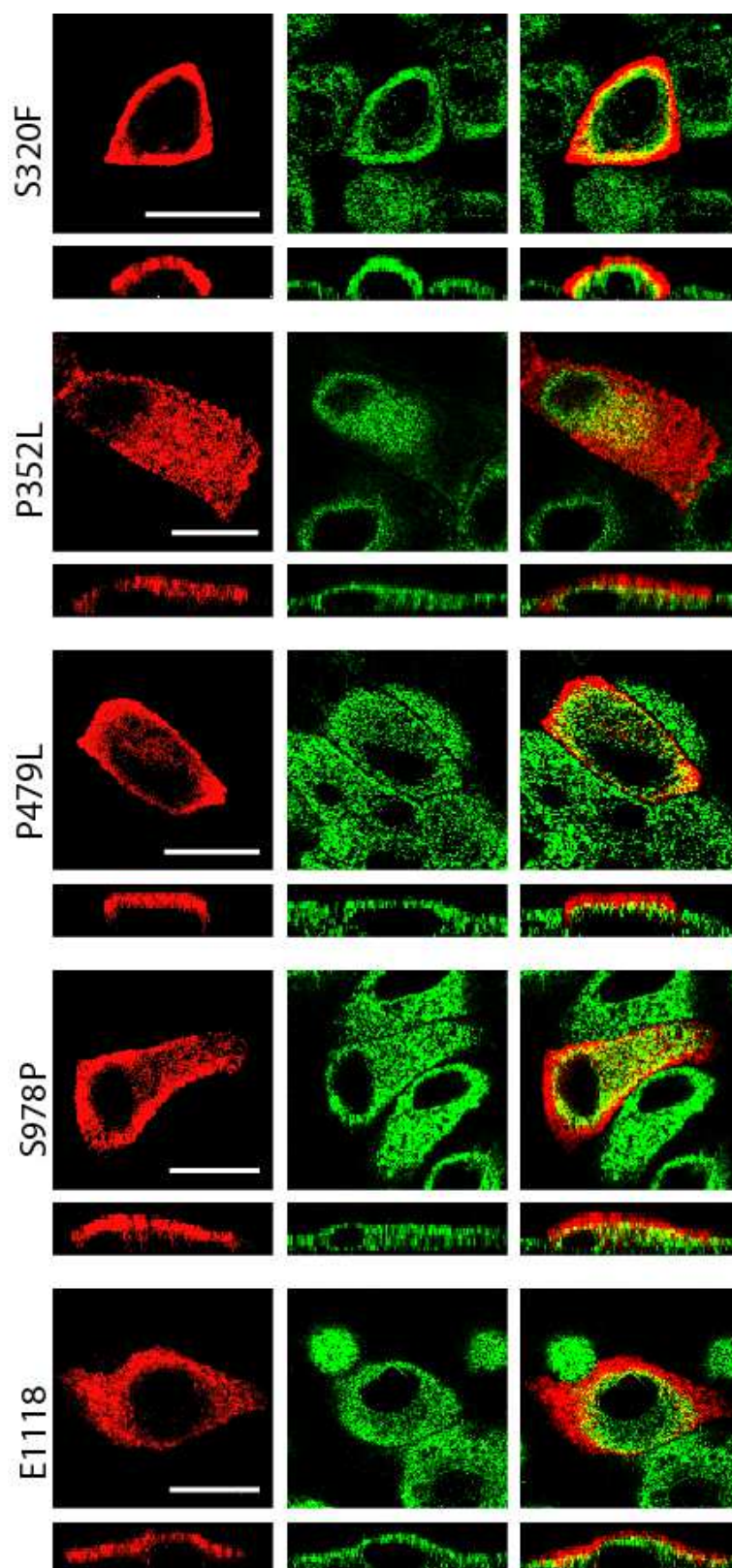
De estos resultados se concluye que las mutaciones G68R, G228R, D459H y A934T dan lugar a una pérdida total de funcionalidad de MDR3, al provocar su retención en el retículo endoplásmico y, por tanto, impedir su tráfico intracelular normal a la membrana apical.

El resto de mutaciones no comprometen la correcta localización de MDR3 en membrana apical. Por ello se analizó un posible efecto sobre la expresión de la proteína o de la actividad traslocadora de fosfolípidos. Dado que las células MDCK-II presentan baja eficiencia de transfección (<5%), ambos estudios se realizaron en células no polarizadas AD-293 (derivadas de las HEK293 pero con mayor capacidad de adhesión al sustrato).



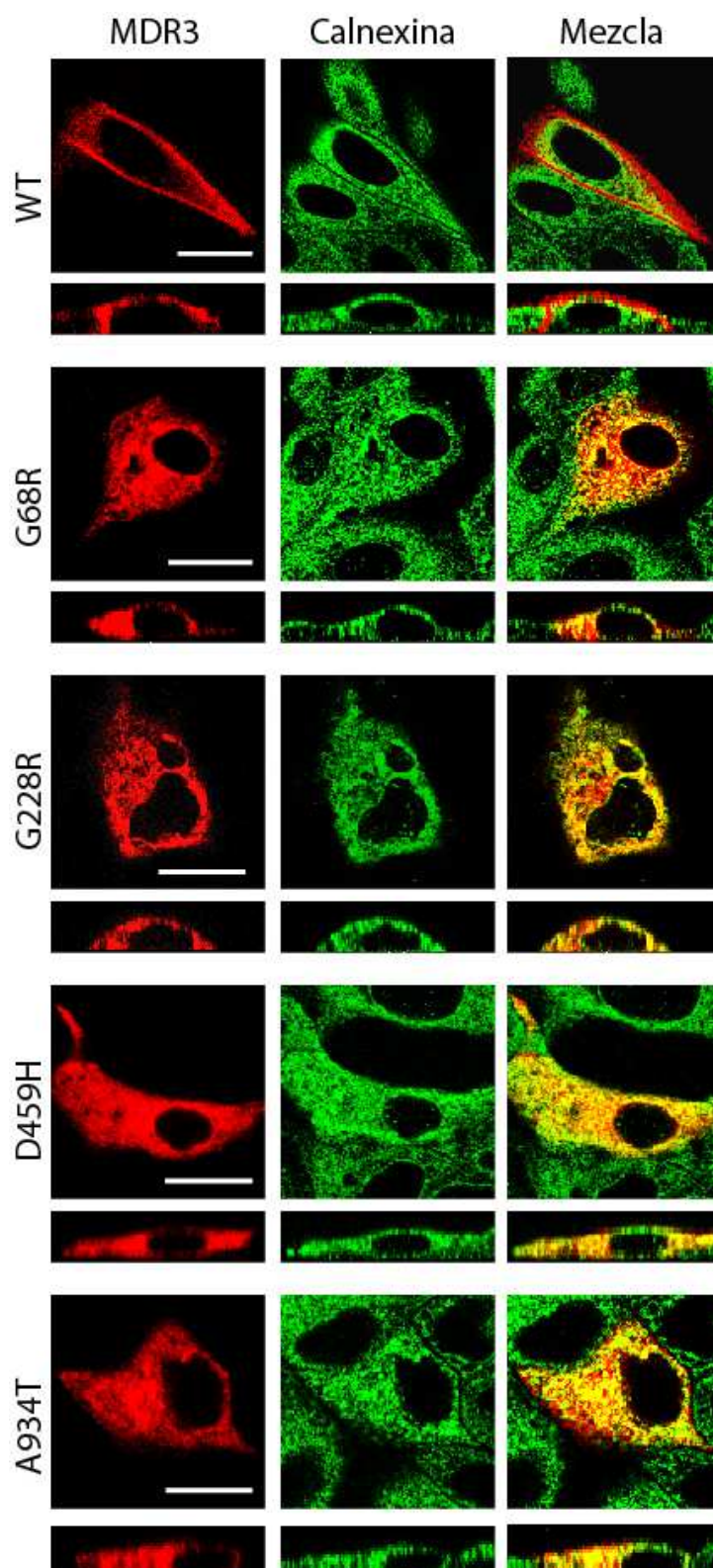
**Figura 9. Detección de la proteína MDR3 salvaje por inmunofluorescencia en células MDCK-II.** Las células MDCK-II se transfectaron transitoriamente con el plásmido que contenía el ADNc de MDR3 salvaje. Tras la fijación y permeabilización, las células se tiñeron con los anticuerpos primarios anti-MDR3 (dilución 1:100) y anti-Calnexina (dilución 1:500). Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 y 488 (dilución 1:200). La localización subcelular se observó mediante microscopía confocal. En cada panel se muestran secciones ópticas x-y (arriba) y x-z (debajo). La fluorescencia en rojo y verde representan MDR3 y calnexina respectivamente. En la superposición de las imágenes de MDR3 y calnexina (panel derecho), el color amarillo denota colocalización de ambas proteínas. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. Escala, 20µm.



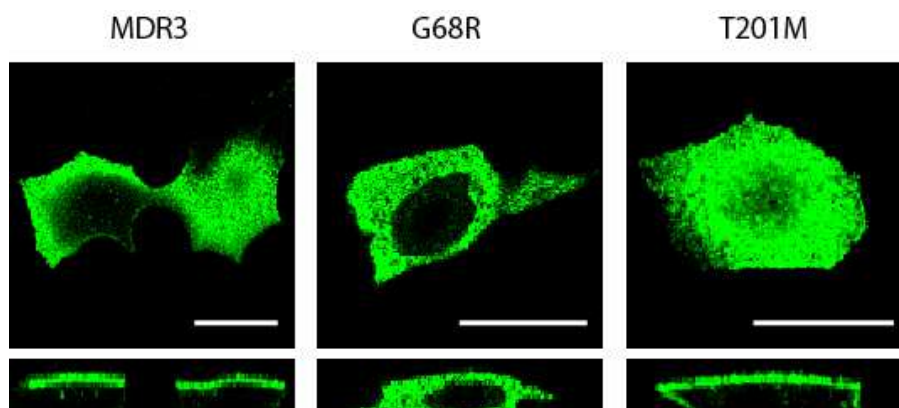


**Figura 10. Mutantes de MDR3 con localización en membrana apical.** Células MDCK-II fueron transfetadas transitoriamente con los correspondientes ADNc y sometidas a inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal. La metodología empleada fue la misma que la detallada en la figura 9.





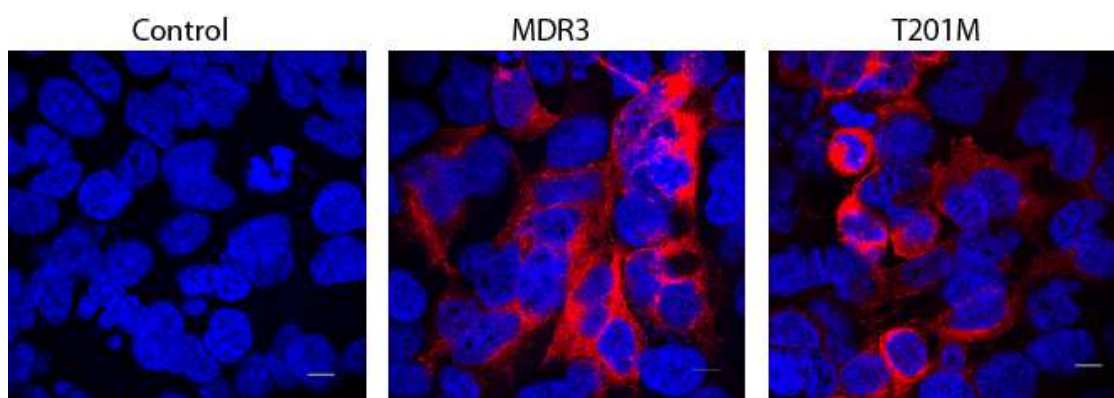
**Figura 11. Mutantes de MDR3 con localización en retículo endoplásmico.** Células MDCK-II fueron transfetadas transitoriamente con los correspondientes ADNc y sometidas a inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal. La metodología empleada fue la misma que la detallada en la figura 9.



**Figura 12. Expresión de mutantes de MDR3 fusionados a GFP en células MDCK-II.** Las células MDCK-II se transfectaron transitoriamente con el plásmido que contenía la secuencia de MDR3 salvaje o de los mutantes G68R y T201M acoplados a GFP. La localización subcelular se observó mediante microscopia confocal. En cada panel se muestran secciones ópticas x-y (arriba) y x-z (debajo). Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. Escala, 20 $\mu$ m.

### 2.3. Estudio de expresión de MDR3

Inicialmente se evaluó la eficiencia de transfección en las células AD-293. Las células se transfectaron transitoriamente con el vector pReceiver-M02 (plásmido vacío) o con los plásmidos portando el ADNc de la MDR3 salvaje y de la forma mutada T201M, y se sometieron a inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-MDR3. En la figura 13 se muestra el análisis por microscopía confocal de un experimento representativo. El marcaje con MDR3 se aprecia en rojo y en azul se visualiza la tinción nuclear con DAPI. La eficiencia de transfección con los plásmidos conteniendo la secuencia salvaje o mutada de MDR3 fue similar y osciló entre el 80-90%. No se observó tinción frente a MDR3 en las células transfectadas con el plásmido vacío.

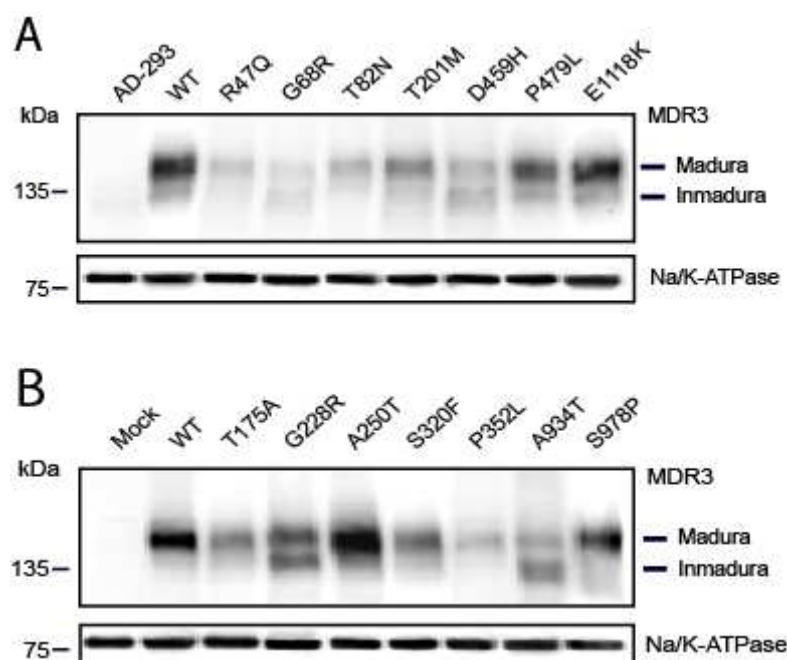


**Figura 13: Eficiencia de transfección en células AD-293.** Las células se transfectaron con el vector pReceiver-M02 o con los plásmidos conteniendo el ADNc de MDR3 salvaje o del mutante T201M, se marcaron con anti-MDR3 y DAPI. En rojo, tinción de MDR3; en azul, tinción con DAPI. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. Para determinar la eficiencia de transfección, se contabilizó el número de células marcadas con el anticuerpo anti-MDR3 respecto al total de células observadas en un mínimo de 10 campos por experimento. Escala 10  $\mu$ m.

El patrón de expresión de los distintos mutantes de MDR3 se analizó mediante *western blot*. Aproximadamente  $0.5 \times 10^6$  células AD-293 se sembraron en placas de 35 mm de diámetro y, 24 horas después, se transfectaron con los plásmidos portando las secuencias mutantes de MDR3 y la secuencia salvaje. Transcurridas 48 horas, las células se lisaron y se obtuvieron los extractos de proteínas totales.

Varios trabajos han evidenciado que en los ensayos de inmunotransferencia se detectan dos formas de MDR3: una mayoritaria, que migra con un peso molecular aparente de aproximadamente 140 kDa, y una minoritaria, de menor peso molecular. La primera corresponde a la proteína madura; la segunda a una forma inmadura, parcialmente glicosilada (Andress et al., 2013; Delaunay et al., 2009; Gautherot et al., 2014; Gautherot et al., 2012; Groen et al., 2011). El mismo comportamiento electroforético fue detectado en nuestros ensayos con lisados de células AD-293 transfectadas con la secuencia de MDR3 salvaje (Figura 14). De los 14 mutantes de MDR3, algunos mostraron un patrón de expresión similar al de la proteína salvaje; en otros se apreció una variación notable en la abundancia relativa de cada forma proteica. Los resultados obtenidos en cuatro experimentos independientes fueron idénticos. Un ejemplo representativo se muestra en la Figura 8. El panel A recoge el efecto de las mutaciones encontradas en niños homocigotos o heterocigotos compuestos (R47Q, T82N, G68R, T201M, D459H, P479L, y E1118K); en el panel B se aprecia el efecto de las mutaciones identificadas en pacientes heterocigotos (T175A, G228R, A250T, S320F, P352L, A934T y S978P).

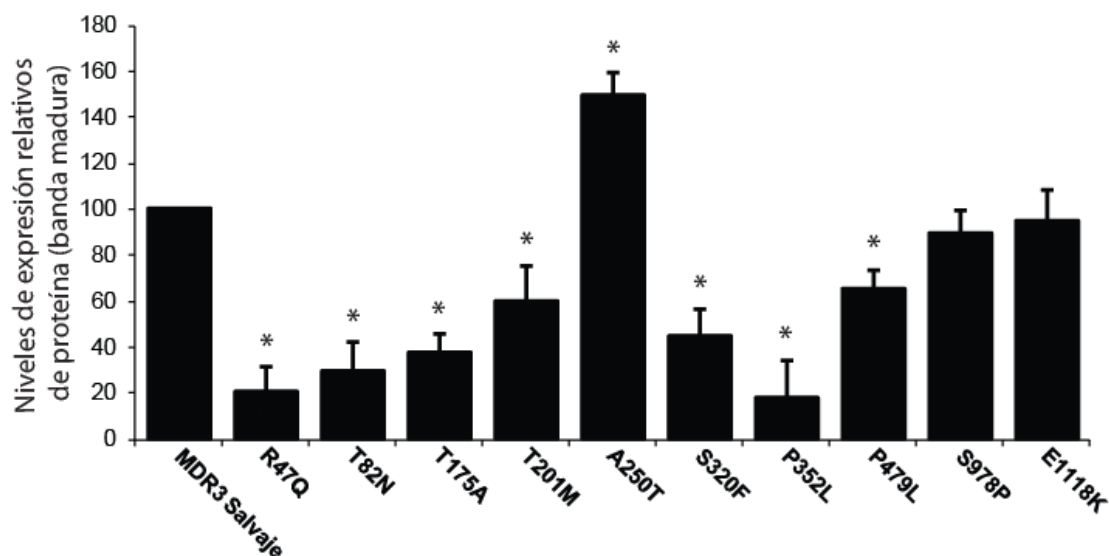
En ambos paneles se muestran los niveles de la proteína de membrana Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa, utilizada como control de carga.



**Figura 14: Western blots representativos de mutantes de MDR3.** La expresión de MDR3 se detectó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal anti-MDR3. Las membranas fueron reincubadas con el anticuerpo anti-Na/K-ATPasa, como control de carga. El total de proteína cargada en cada pocillo fue 30 µg.

No se apreciaron diferencias en los niveles de expresión de los mutantes S978P y E1118K respecto a la proteína MDR3 salvaje. Las mutaciones R47Q, G68R, T82N, T175A, T201M, G228R, S320F, P352L, D459H, P479L y A934T provocaron una disminución de ambas formas de la proteína. Por el contrario, la mutación A250T favoreció un aumento en los niveles de proteína respecto a la MDR3 salvaje. En los mutantes G68R, G228R, D459H y A934T, además de una marcada reducción en la expresión de la proteína, se evidenció una inversión en la proporción de la banda correspondiente a la forma madura respecto a la inmadura, siendo esta última la forma predominante detectada. Este resultado concuerda con la ubicación mayoritaria de estos 4 mutantes en el retículo endoplásmico (Figura 11). En el siguiente histograma se muestran los niveles de expresión de los 10 mutantes con localización en membrana apical (Figura 15). Los valores corresponden a la forma madura (banda superior) de cada mutante.

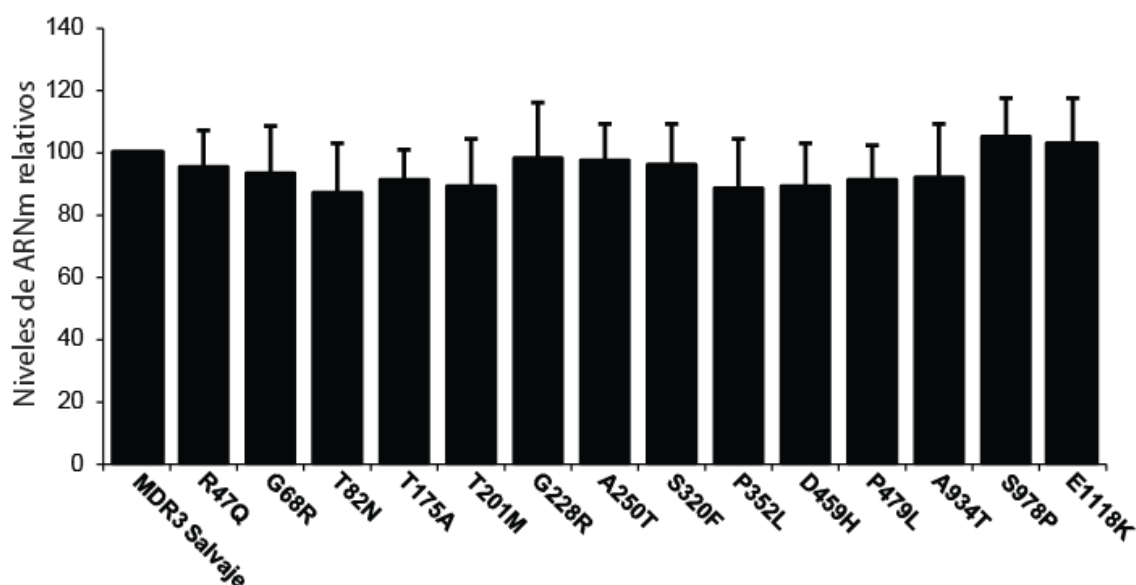




**Figura 15: Niveles relativos de la forma madura de MDR3 en mutantes con localización en membrana.** Los valores densitométricos de la banda superior fueron normalizados por los de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y están expresados como porcentaje de MDR3 Salvaje (\*p<0.05).

#### 2.4. Estudio de expresión de ARNm por PCR cuantitativa

En ocasiones, una mutación puede producir la desestabilización del ARNm. Esto conduciría a una degradación prematura y consecuentemente, menor cantidad de proteína traducida (Shyu *et al.*, 2008). Para analizar si las diferencias observadas en los niveles de proteína de los distintos mutantes eran debidas a la disminución del grado de expresión/estabilidad de su ARNm, éste se cuantificó mediante PCR cuantitativa a tiempo real. En la Figura 16 se muestran los niveles de ARNm de MDR3 salvaje y los 14 mutantes, obtenidos tras transfección transitoria de células AD-293 con los correspondientes plásmidos y normalizados por los valores de  $\beta$ -actina. No se observaron diferencias significativas entre los distintos mutantes, lo que indica que las disminuciones encontradas en los niveles de proteína no obedecen a un efecto de la mutación sobre la estabilidad del ARNm.



**Figura 16. PCR cuantitativa a tiempo real de ARNm de mutantes de *ABCB4*.** Los ARN utilizados para el ensayo fueron aislados de alícuotas de los mismos cultivos celulares usados para el análisis de expresión de proteína. Los valores de ARNm de *ABCB4* fueron normalizados frente a los de  $\beta$ -actina. Los datos representan la media  $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes.

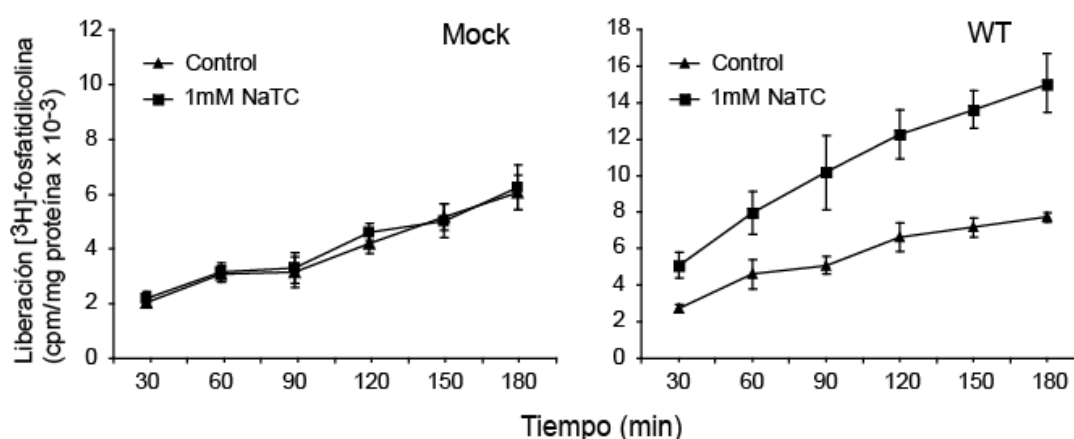
## 2.5. Determinación de la funcionalidad de MDR3

El impacto de las mutaciones de MDR3 que provocan la retención de la proteína en el retículo endoplásmico es evidente: conllevan la ausencia de actividad traslocadora de fosfatidilcolina en la membrana apical. Respecto a las mutaciones que no afectan a la correcta localización de la proteína en membrana ni a su nivel de expresión, consideramos como hipótesis más plausible un efecto sobre la funcionalidad de MDR3. Asimismo, la reducción de los niveles de proteína que manifiestan otros mutantes debería traducirse *in vivo* en una disminución de la actividad flopasa para fosfatidilcolina con colina tritiada, de MDR3. Para confirmar estas hipótesis, desarrollamos un ensayo de funcionalidad de MDR3 basado en el hecho de que la colina que las células incorporan es en su mayoría convertida a fosfatidilcolina (Li *et al.*, 2005), y en que las moléculas de fosfatidilcolina que se integran en la cara externa de la bicapa lipídica pueden ser extraídas al medio de cultivo mediante la adición de sales biliares (Groen *et al.*, 2011; Morita *et al.*, 2007; Ruetz, Gros, 1995). De esta forma, en células que expresan MDR3, la diferencia en la radiactividad liberada al medio de cultivo en presencia y ausencia de la sal biliar refleja el grado de actividad flopasa para fosfatidilcolina.

Los ensayos de funcionalidad se llevaron a cabo en células AD-293, no sólo por su alta eficiencia de transfección, sino porque, al no ser polarizadas, la expresión de MDR3 se

distribuye por toda la membrana plasmática, lo cual posibilita la exposición de un mayor número de moléculas de fosfatidilcolina en la cara externa de la bicapa lipídica.

Las células transfectadas con los distintos plásmidos se mantuvieron 1 hora en medio de cultivo mínimo deficiente en colina y, posteriormente, se incubaron durante 3 horas en el mismo medio suplementado con [ $^3\text{H}$ ]-colina. Tras exhaustivos lavados, las células se incubaron 3 horas adicionales en medio mínimo en presencia o ausencia de taurocolato sódico (NaTC) 1mM. Durante este período, se retiraron alícuotas del medio de cultivo cada 30 minutos para cuantificar la radiactividad liberada. En las células transfectadas con el plásmido vacío, la cinética de liberación de lípidos conteniendo [ $^3\text{H}$ ]-colina fue prácticamente idéntica en presencia o ausencia de NaTC (Figura 17). En ambos casos se apreció un ligero incremento en los niveles de radiactividad a lo largo del tiempo, que podría ser debido a difusión de fosfatidilcolina a través de la membrana (Smith *et al.*, 1994).

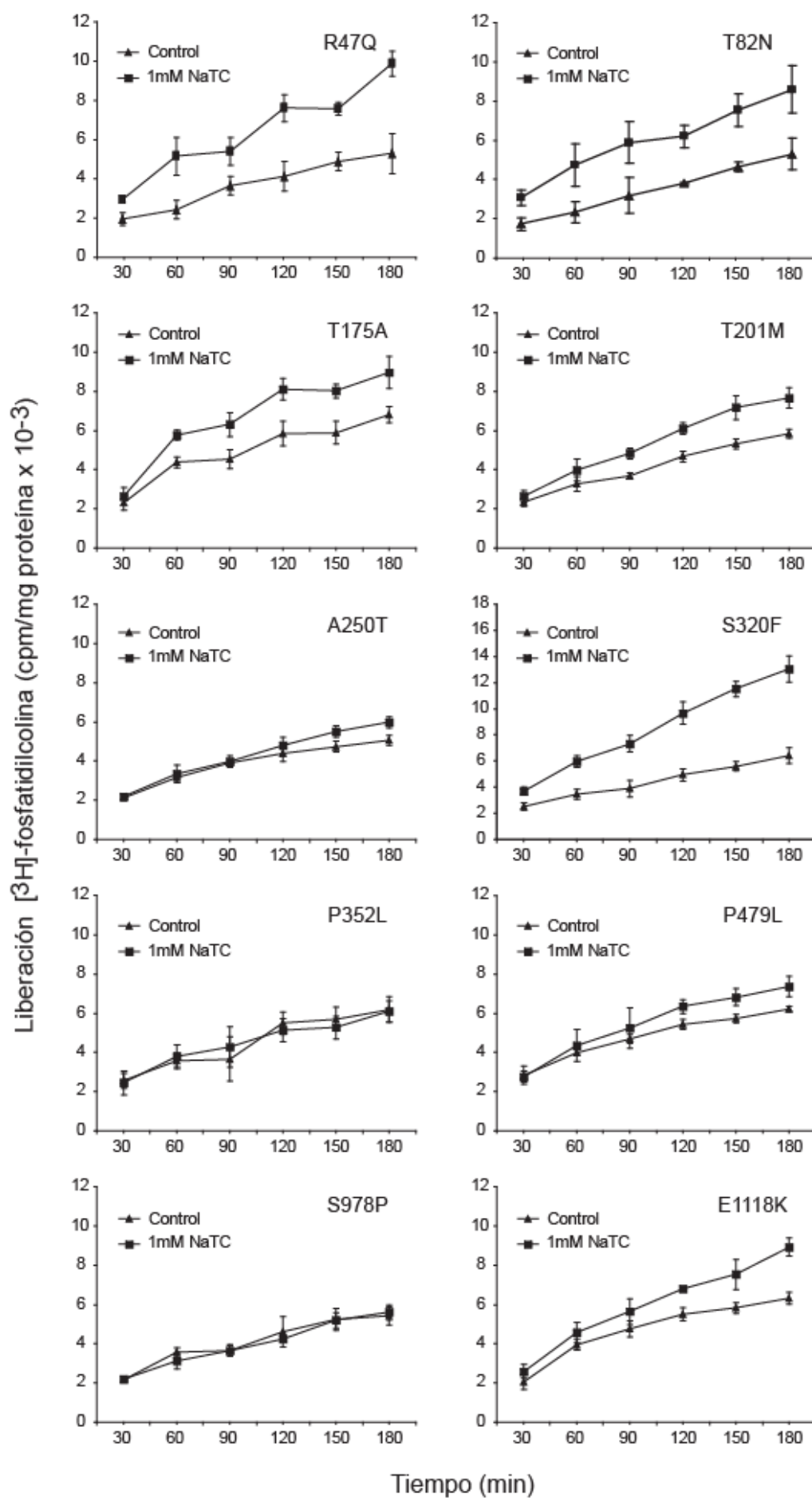


**Figura 11: Liberación de [ $^3\text{H}$ ]-fosfatidilcolina mediada por MDR3.** Curvas de liberación de [ $^3\text{H}$ ]-fosfatidilcolina con o sin NaTC en células AD-293 transfectadas con el vector vacío (mock) o con el ADNc de *ABCB4* salvaje (WT). Las células transfectadas fueron preincubadas 1h en EMEM y posteriormente marcadas con 2  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  de [ $^3\text{H}$ ]-colina durante 3h. A continuación, se lavaron dos veces. El último lavado no contenía una cantidad significativa de radiactividad. Por último, las células se incubaron durante 3h en presencia o ausencia de 1mM NaTC. Se recogieron alícuotas de medio de cultivo a los tiempos indicados y se cuantificó la radiactividad mediante un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresan relativos a la cantidad de proteína total. Los datos se muestran como medias  $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes.

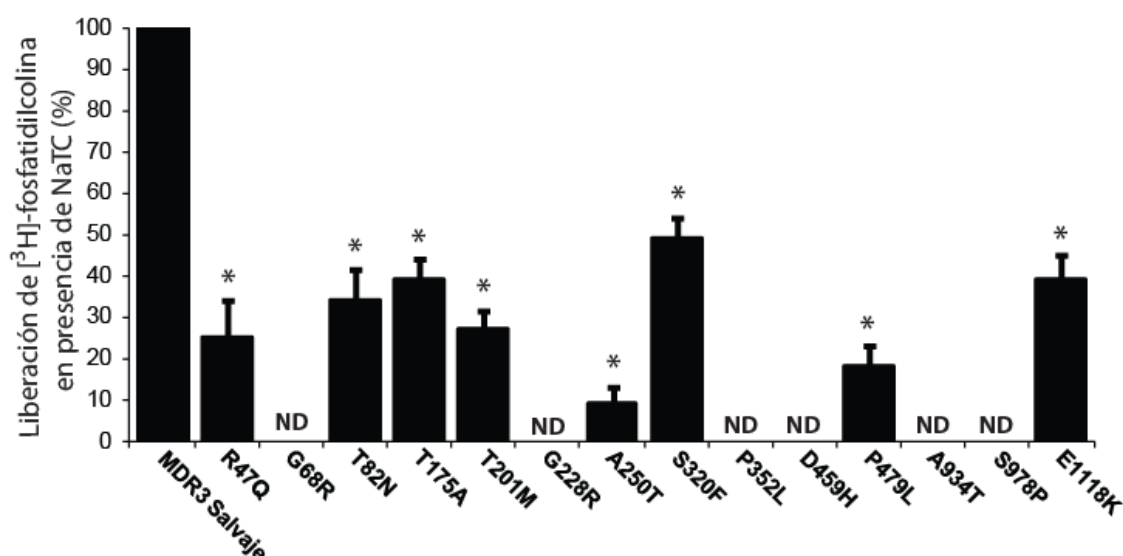
En las células que expresaban la MDR3 salvaje, un aumento en la liberación de radiactividad fue observado 30 minutos después de la adición de NaTC (Figura 17), indicativo de que en este corto período de tiempo ya hay una mayor cantidad de lípidos marcados en la cara externa de la membrana plasmática. Después de 90 minutos, la radiactividad liberada al

medio de cultivo en las células tratadas con NaTC fue aproximadamente el doble que en las células no tratadas. Esta diferencia se mantuvo constante en los siguientes intervalos de tiempo ensayados. Las células que expresaban los mutantes R47Q, T82N, T175A, T201M, A250T, S320F, P479L y E1118K tratadas con NaTC liberaron menor cantidad de [ $^3$ H]-fosfatidilcolina al medio en comparación con las que expresaban la MDR3 salvaje (Figura 18). Además, en la mayoría se observó un retraso en el tiempo de aparición de radiactividad en el medio respecto a las células que expresaban la MDR3 salvaje. El máximo de liberación se alcanzó 120-150 minutos después de la adición de NaTC. Las curvas de liberación de lípidos marcados en función del tiempo en las células que expresaban los mutantes P352L y S978P fueron muy similares en presencia o ausencia de NaTC (Figura 18), lo cual sugiere que estas mutaciones anulan totalmente la actividad de MDR3. Idénticos resultados se obtuvieron en los cultivos de los mutantes que presentaban localización en el retículo endoplásmico, G68R, G228R, D459H y A934T. Una aproximación al grado de funcionalidad de cada mutante de MDR3 respecto a la proteína salvaje se muestra en la figura 19, que recoge el porcentaje de [ $^3$ H]-fosfatidilcolina liberada al medio tres horas después de la adición de NaTC.

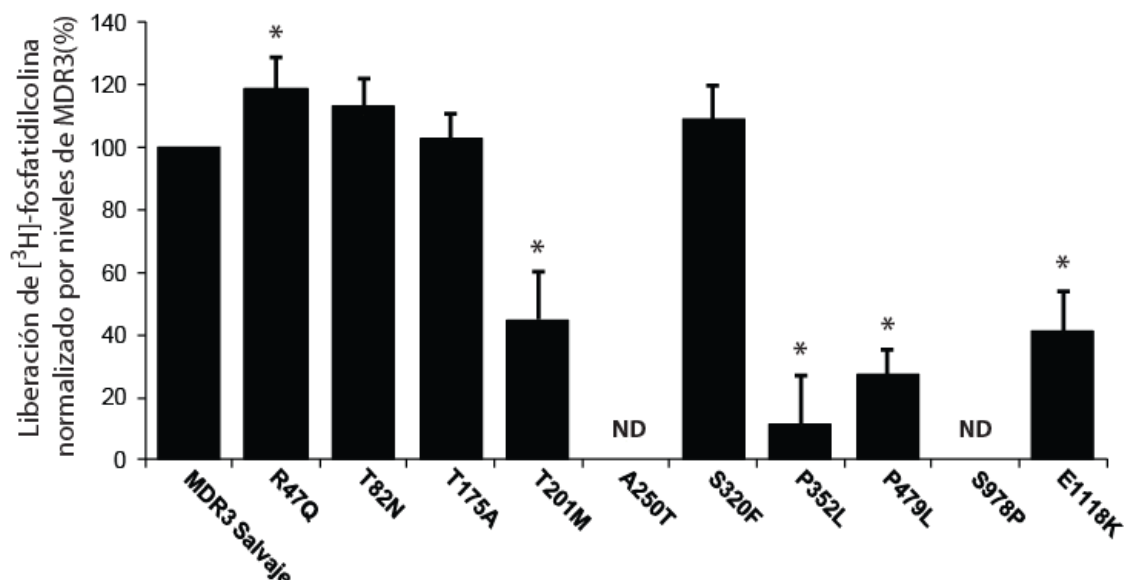
A continuación, evaluamos el grado de actividad de MDR3 que retienen los mutantes con localización normal en la membrana normalizando los valores recogidos en la figura 19 por los niveles de proteína madura detectados en los ensayos de *western blot* (Figura 14; bandas superiores). Los resultados se muestran en la figura 20. De ellos se deduce que los mutantes R47Q, T82N, T175A y S320F son completamente activos. El resto de mutaciones afectan de forma específica a la actividad de MDR3 en distinta medida. Las proteínas mutantes P352L y S978P carecen de funcionalidad y el resto posee una actividad parcial de MDR3.



**Figura 18: Liberación de [ $^3$ H]-fosfatidilcolina en células que expresan mutantes de MDR3.** Curvas de liberación de [ $^3$ H]-fosfatidilcolina con o sin NaTC en células AD-293 transfectadas con los mutantes de *ABCB4*. La metodología empleada fue la misma que la mencionada en la figura 17. Los datos se muestran como medias  $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes.



**Figura 19. Grado de funcionalidad de los mutantes de MDR3.** Las medidas de la radioactividad liberada al medio tres horas después de la adición de NaTC se restaron de aquéllas obtenidas en ausencia de NaTC. Los resultados se muestran en porcentaje respecto a la MDR3 salvaje. (\* $p > 0.05$ ) ND, no detectado.



**Figura 20. Liberación de [ $^3$ H]-fosfatidilcolina dependiente de NaTC normalizada por la forma madura de MDR3.** Los valores se obtuvieron restando la radioactividad liberada al medio en ausencia de NaTC y fueron normalizados frente a los niveles de proteína madura. Los resultados se muestran en porcentaje respecto a la MDR3 salvaje. (\* $p > 0.05$ ) ND, no detectado.

### 3. Correlación genotipo-fenotipo-efecto terapéutico

Los pacientes 1-4 presentan mutaciones que presumiblemente alteran de forma drástica la estructura o expresión de la proteína. De ellos, sólo fue posible realizar el análisis inmunohistoquímico en el caso 1. Este paciente portaba una mutación susceptible de alterar el *splicing* y otra missense, lo que explica la ausencia de expresión de MDR3 en la muestra hepática analizada. Este niño desarrolló daño hepático progresivo, refractario al tratamiento con AUDC, que hizo necesaria la realización de un trasplante de órgano.

En los 12 pacientes restantes (casos 5-16), la caracterización *in vitro* de sus respectivas mutaciones permite establecer correlaciones genotipo-fenotipo-efecto terapéutico (Tabla 5). Los pacientes 5 y 6, una pareja de hermanos, presentaban una mutación missense en homocigosis que da lugar a la retención intracelular de MDR3. Acorde con este dato, el análisis inmunohistoquímico de la biopsia hepática reveló una ausencia total de MDR3 en la membrana canalicular de los hepatocitos. Ambos niños han precisado también de un trasplante hepático. En el estudio inmunohistoquímico de la biopsia hepática del paciente 8, comparado con el de un hígado sano, se apreció una tinción canalicular débil para MDR3. Este paciente portaba dos mutaciones missense: una de ellas, D459H, impide el tráfico de MDR3 a la membrana apical; la otra, P479L, disminuye la actividad de la proteína en aproximadamente un 80%. Por tanto, la actividad total de MDR3 estimada fue de un 10% respecto a la normal. A pesar del tratamiento farmacológico, el niño mostró progresión de la enfermedad hepática, aunque más lenta que en los casos anteriores. Finalmente, requirió un trasplante hepático. El paciente 7, que portaba las mutaciones R47Q y T82N, también presentaba tinción débil de MDR3 en la biopsia hepática. Los ensayos de inmunofluorescencia revelaron que ambas mutaciones mantenían la correcta localización en membrana apical. Sin embargo, la expresión de ambos mutantes era muy baja (alrededor del 30% con respecto a la MDR3 salvaje), lo que explica los resultados obtenidos en el ensayo inmunohistoquímico. El caso 9 era heterocigoto compuesto para las mutaciones T201M y E1118K, que no afectan a la localización de la proteína en la membrana apical. De los análisis funcionales se estima que estos dos pacientes, 7 y 9, mantienen aproximadamente un 30% de actividad MDR3. Ambos llevan más de 10 años bajo tratamiento con AUDC y en la actualidad se encuentran asintomáticos. En la biopsia hepática del paciente 15 se evidenció una expresión canalicular débil de MDR3. Consecuentemente, los estudios *in vitro* mostraron que la única mutación monoalélica que se le había detectado conduce a la retención intracelular de la proteína.

En el resto de pacientes, que también presentaban una única mutación en heterocigosis, la actividad MDR3 estimada fue de un 50% o mayor. Excepto el caso 11, que requirió un trasplante hepático, los demás están respondiendo favorablemente al tratamiento crónico con AUDC. En las ocasiones en que se ha interrumpido la administración del fármaco, los síntomas colestásicos han recidivado, y han vuelto a remitir tras retomar el tratamiento.

**Tabla 5. Correlación de la actividad estimada de MDR3 con la evolución de la enfermedad en pacientes con mutaciones *missense*.** A. Heterocigoto compuesto, B. Homocigoto, C. Heterocigoto; TH, trasplante hepático; AUDC, ácido deoxicólico

Paciente	Actividad de MDR3 estimada	Edad de presentación enfermedad	Evolución
5 <sup>B</sup>	0%	1.6 años	Trasplante hepático
6 <sup>B</sup>	0%	1.8 años	Trasplante hepático
7 <sup>A</sup>	~30%	23 años	Responde AUDC
8 <sup>A</sup>	~9%	3.5 años	Trasplante hepático
9 <sup>A</sup>	~34%	0.9 años	Responde AUDC
10 <sup>C</sup>	~70%	0.2 años	Responde AUDC
11 <sup>C</sup>	~50%	9 años	Trasplante hepático
12 <sup>C</sup>	~55%	13 años	Responde AUDC
13 <sup>C</sup>	~75%	2 años	Responde AUDC
14 <sup>C</sup>	~50%	0.2 años	Trasplante hepático
15 <sup>C</sup>	~50%	11 años	Lista espera TH
16 <sup>C</sup>	~50%	8.5 años	Responde AUDC



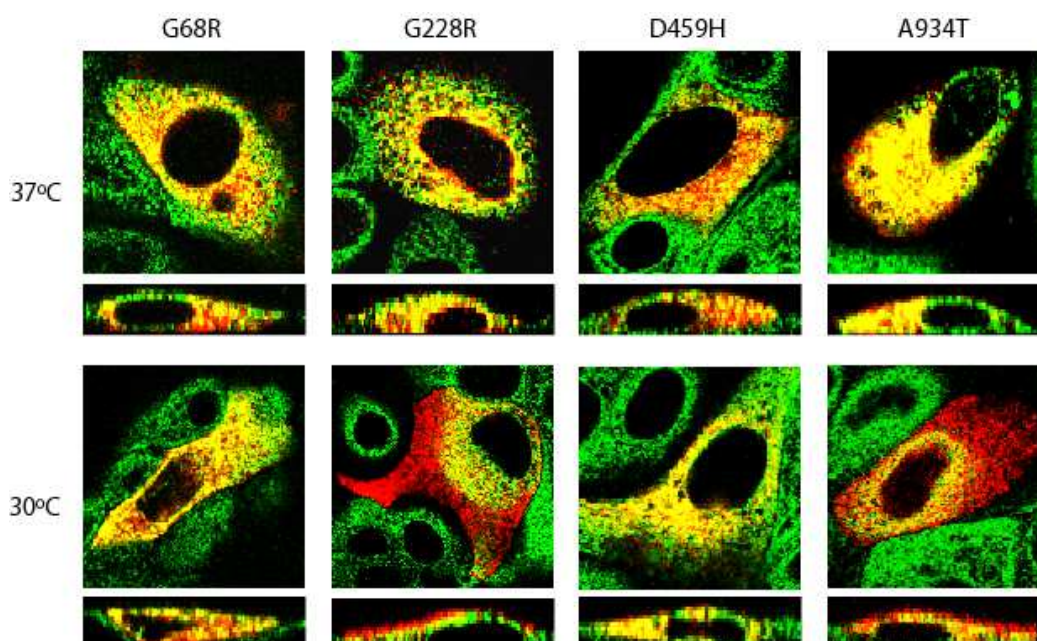
## 4. Rescate farmacológico de mutantes con retención en el retículo endoplásmico

Cuatro de las mutaciones identificadas en el gen *ABCB4* provocan la retención de la proteína MDR3 en el retículo endoplásmico. Este efecto, junto con la observación de que los cuatro mutantes presentan niveles reducidos de proteína con predominio de la forma inmadura, sugiere una posible alteración en el plegamiento de la proteína. Para confirmar este punto y analizar la posibilidad de revertir el efecto de estas mutaciones, se realizaron ensayos de incubación a baja temperatura y tratamientos con chaperonas químicas, dos procedimientos que se han mostrado eficaces en la restauración del correcto plegamiento de algunas proteínas mutadas (Brown *et al.*, 1996; Denning *et al.*, 1992).

### 3.1. Efecto de la temperatura sobre la localización subcelular de mutantes de MDR3.

Células MDCK-II se sembraron sobre cubreobjetos y se transfectaron transitoriamente con los vectores que portaban las secuencias mutantes de MDR3 G68R, G228R, D459H y A934T, así como la proteína salvaje. Veinticuatro horas después de la transfección, duplicados de los cultivos se incubaron a 30°C ó 37°C. Transcurridas otras 24 horas, se realizó el análisis por inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-MDR3 y anti-calnexina. En la figura 21 se muestra la superposición de las imágenes de MDR3 y calnexina obtenidas por microscopía confocal.

En las células transfectadas con el cDNA de la MDR3 salvaje, la proteína se detectó mayoritariamente en la membrana apical independientemente de la temperatura de incubación. La disminución de temperatura no tuvo efecto sobre la retención intracelular de las proteínas mutantes G68R y D459H, detectándose ambas en el retículo endoplásmico (Figura 21). Por el contrario, la incubación a 30°C de las células que expresaban los mutantes G228R y A934T condujo a la localización de las respectivas proteínas en la membrana apical. Este resultado indica que el procesamiento y tráfico intracelular de ambos mutantes se revierte hacia el fenotipo MDR3 salvaje al disminuir la temperatura, y apoya que las respectivas mutaciones provocan un defecto en el plegamiento de la proteína.



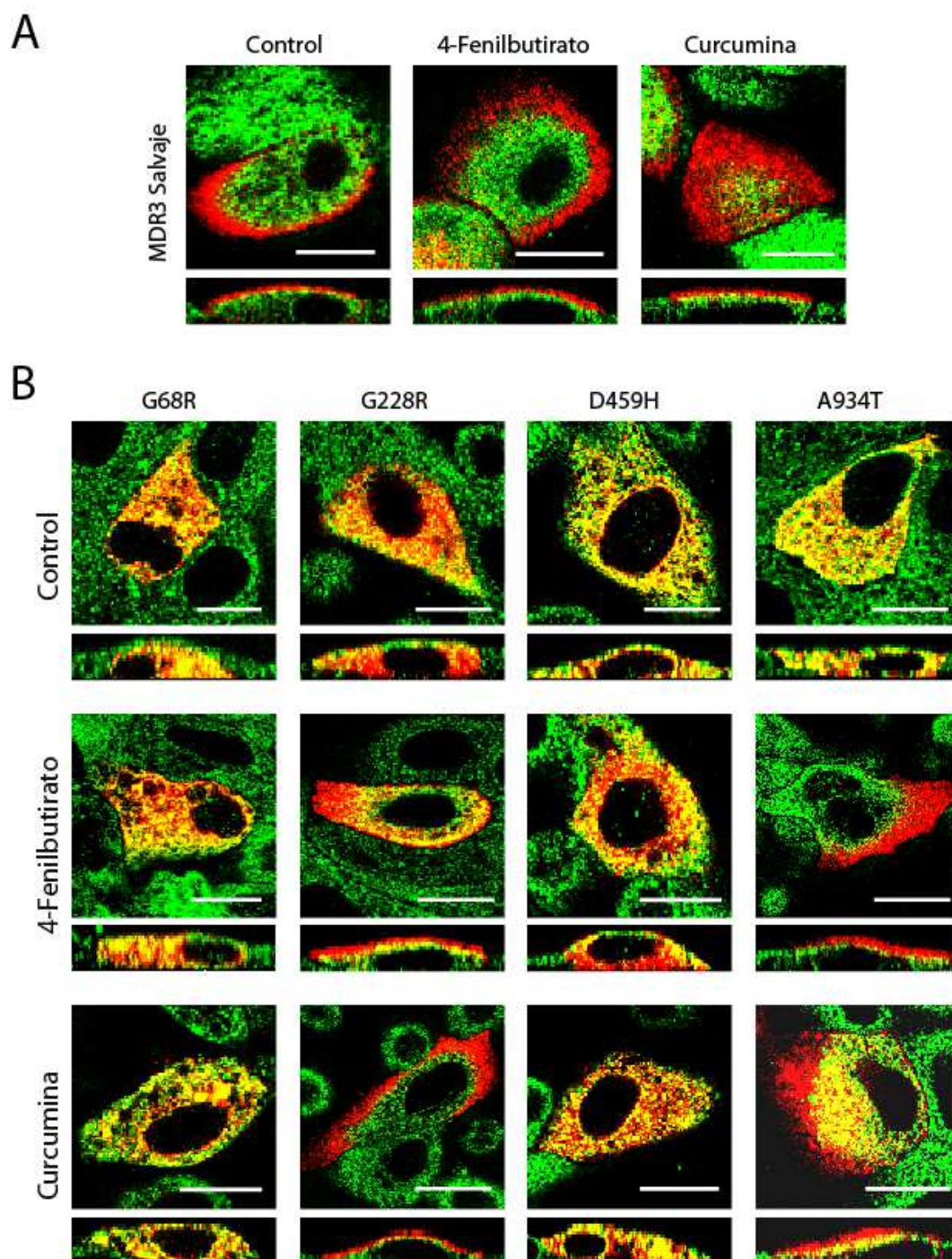
**Figura 21. Mutantes de MDR3 con localización en retículo endoplásmico incubados a baja temperatura.** Células MDCK-II fueron transfectadas transitoriamente con los correspondientes ADNc, incubadas a 30°C ó 37°C y sometidas a inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal. Las figuras corresponden a la superposición de las imágenes obtenidas con los anticuerpos anti-MDR3 y calnexina, como se menciona en el pie de la figura 3. La fluorescencia en rojo y verde representan MDR3 y calnexina respectivamente; el color amarillo revela colocalización de ambas proteínas. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes. Escala, 20  $\mu$ m.

### 3.2. Rescate de la localización apical de proteínas MDR3 mutantes mediante adición de chaperonas químicas

Ante la posibilidad de que algunos mutantes obedezcan a defectos de plegamiento, nos planteamos evaluar un posible rescate de los mismos mediante la utilización de chaperonas, que tendría un evidente potencial terapéutico. Seleccionamos dos compuestos aprobados para su utilizados en la práctica clínica y que, entre otras propiedades, tienen actividad chaperona: el 4-fenilbutirato (4-PBA) y la curcumina. El primero está indicado en trastornos del ciclo de la urea; el segundo en la deficiencia de la alfa-1-antitripsina. Ambas moléculas tienen distintos mecanismos de acción.

Inicialmente, se evaluó el potencial de los dos compuestos para restaurar la correcta localización de las proteínas mutantes en la membrana apical, mediante ensayos de inmunofluorescencia. Células MDCK-II transfectadas con los plámidos portando las secuencias mutantes y salvaje de MDR3 se incubaron en presencia de dosis farmacológicas de 4-PBA (1,

2.5 y 5mM) o curcumina (1, 2.5, 5 $\mu$ M) durante 24 horas. En la figura 22 se muestra la visualización por microscopía confocal de un experimento representativo a dosis de 1mM de 4-PBA y 1  $\mu$ M de curcumina. En las células que expresaban la MDR3 salvaje, no se detectaron diferencias en la expresión apical de la proteína en presencia o ausencia de 4-PBA o curcumina. El tratamiento farmacológico no fue capaz de revertir el efecto de las mutaciones G68R y D459H, observándose con todas las dosis ensayadas la retención de las proteínas mutantes en el retículo endoplásmico.



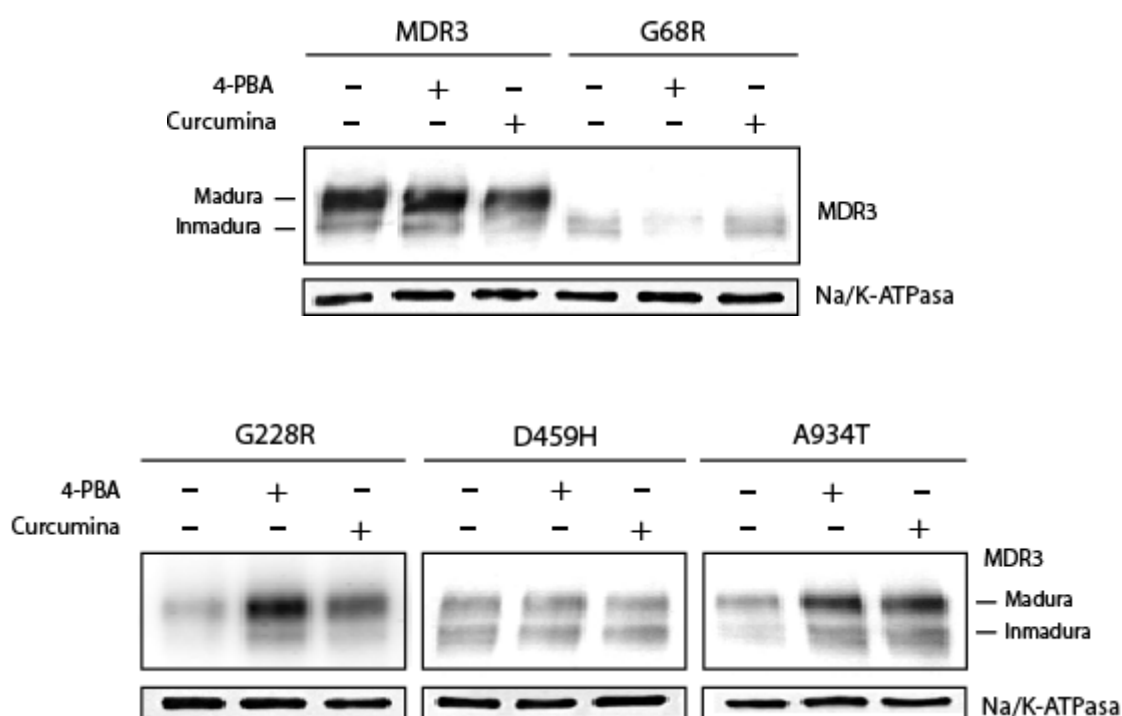
**Figura 22. Mutantes de MDR3 con localización en retículo endoplásmico tratados con 4-PBA y curcumina.** Células MDCK-II fueron transfectadas transitoriamente con el ADNc de MDR3 salvaje (A) o de los mutantes que presentan retención en retículo endoplásmico (B). Transcurridas 24 horas las células se incubaron con 1mM de 4-PBA o 1 $\mu$ M de curcumina. 24 horas después fueron sometidas a inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal. La metodología empleada fue la misma que en la figura 3. En la proyección ortogonal (paneles inferiores), se aprecia la localización apical (en rojo) de los mutantes de MDR3 G228R y A934T tras el tratamiento con cualquiera de las dos chaperonas farmacológicas.

Sin embargo, los mutantes G228R y A934T mostraron una localización predominantemente apical tras la adición de cualquiera de las chaperonas farmacológicas. Este efecto se detectó incluso a las dosis más bajas ensayadas con ambos compuestos.

### **3.3. Análisis del patrón de expresión de los mutantes de MDR3 tratados con 4-PBA o curcumina.**

A continuación se analizó el efecto del 4-PBA y la curcumina sobre el patrón de expresión de las cuatro proteínas mutantes que presentan retención en el retículo endoplásmico. Como se ha descrito anteriormente, estos mutantes manifiestan, en ensayos por inmunotransferencia, una expresión reducida respecto a la MDR3 salvaje y un predominio de la forma inmadura de la proteína.

La adición de las chaperonas farmacológicas a las células transfectadas no modificó el patrón de expresión de la MDR3 salvaje ni de los mutantes G68R y D459H (Figura 23). En estos últimos no se detectó aumento de la forma madura de la proteína, un resultado que es consistente con los obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia, que reflejaron ausencia de localización apical tras la incubación con 4-PBA o curcumina. Por el contrario, en las células que expresaban los mutantes G228R y A934T, el tratamiento con las chaperonas farmacológicas indujo un aumento de los niveles de la forma madura de la proteína, que, en el caso de G228R, fue más acusado con 4-PBA. Este incremento no se correspondió, en ambos mutantes, con una disminución de la abundancia de la forma inmadura (Figura 23). Este hecho sugiere una acción de las chaperonas favoreciendo el plegamiento y estabilización de una fracción del total de proteína expresada. Los resultados de estos ensayos de inmunotransferencia concuerdan con los obtenidos en los análisis de localización intracelular de los mutantes, dado que sólo las formas maduras, completamente glicosiladas, de proteínas de membrana son capaces de migrar del retículo endoplásmico (Ferris *et al.*, 2014).



**Figura 23:** *Western blots* representativos de mutantes de MDR3 con localización en retículo endoplásmico tratados con 1mM 4-PBA y 1μM curcumina. La expresión de MDR3 se detectó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal anti-MDR3. Las membranas fueron reincubadas con el anticuerpo anti-Na/K-ATPasa, como control de carga. El total de proteína cargada en cada pocillo fue 30 μg.

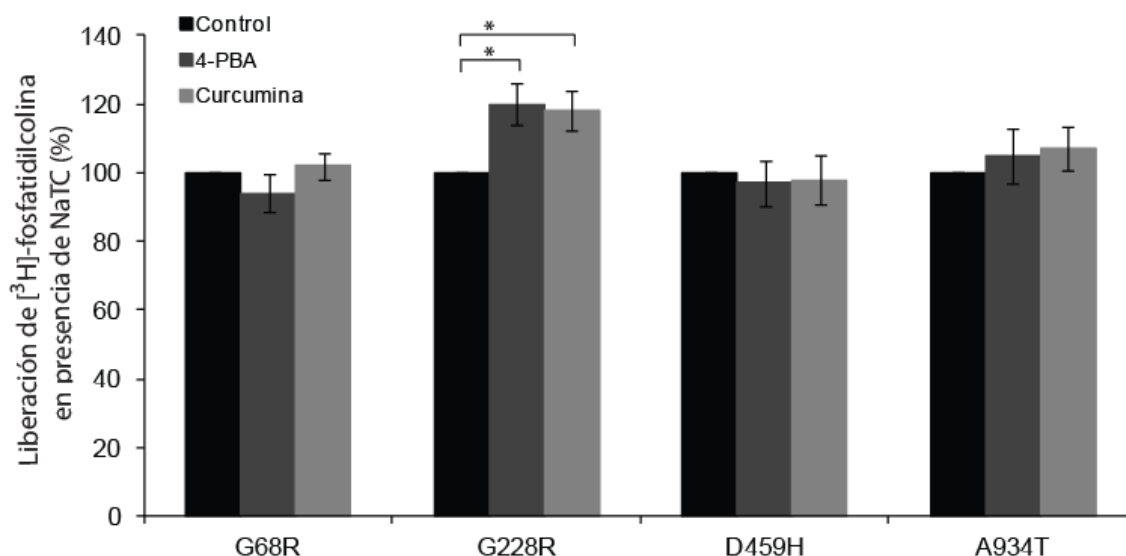
### 3.4. Determinación de la actividad de mutantes de MDR3 tratados con 4-PBA o curcumina

Por último, analizamos si los mutantes de MDR3 que muestran una correcta localización en membrana apical tras el tratamiento con chaperonas farmacológicas son activos, es decir poseen capacidad traslocadora de PC.

Para ello, células AD-293 fueron transfectadas con los correspondientes plásmidos e incubadas en presencia o ausencia de 1mM de 4-PBA o 1μM de curcumina. Después de 24 horas, las células se trataron con 1mM de NaTC. El ensayo de funcionalidad tal y como se describe en el apartado 2.5.

En las células transfectadas con los plásmidos G68R y D459H, el porcentaje de liberación de lípidos conteniendo [ $^3$ H]-colina, tras la adición de la sal biliar, fue prácticamente idéntico en presencia o ausencia de los tratamientos farmacológicos (Figura 24). Idénticos resultados se observaron para el mutante A934T, lo cual sugiere que la proteína no es activa a

pesar de su correcta localización en la membrana apical. En las células que expresaban el mutante G228R, el tratamiento con 4-PBA o curcumina indujo en ambos casos un aumento de aproximadamente un 20% en la liberación de [ $^3$ H]-fosfatidilcolina al medio de cultivo (Figura 23). Este resultado sugiere que el mutante G228R retiene, al menos parcialmente, actividad, y su migración a la membrana apical puede promover la secreción de PC.



**Figura 24: Liberación de [ $^3$ H]-fosfatidilcolina dependiente de NaTC en células que expresan mutantes de MDR3 tratadas con 1mM 4-PBA y 1  $\mu$ M curcumina.** La radioactividad liberada al medio de cultivo tres horas después de la adición de NaTC fue cuantificada y restada de aquella liberada en ausencia de NaTC. Los resultados, normalizados frente a la cantidad de proteína total, se muestran en porcentaje, respecto a los valores obtenidos en las células sin tratar para cada mutante. (\*p<0.05)

## **Discusión**





La proteína MDR3 es responsable de la secreción de fosfatidilcolina a la bilis, un proceso esencial para proteger las membranas celulares hepáticas de la acción detergente de los sales biliares (Oude Elferink, Paulusma, 2007). La deficiencia de MDR3, consecuencia de defectos en el gen que la codifica, *ABCB4*, ha sido asociada al desarrollo de un amplio espectro de trastornos hepatobiliares que se manifiestan en la edad infantil y adulta (Davit-Spraul et al., 2010). Hasta la fecha, se han identificado alrededor de 150 variantes génicas en *ABCB4*, que en su mayoría representan cambios *missense* (<http://abcmutations.hegelab.org>). Sin embargo, la implicación de la mayor parte de estas mutaciones en el desarrollo de la enfermedad hepática es controvertida. Ello es debido a la alta frecuencia de heterocigosidad observada en individuos afectados y al hecho de que la mayoría de mutaciones no han sido caracterizadas funcionalmente, lo que impide establecer correlaciones genotipo-fenotipo. Estudios recientes han abordado las consecuencias de un reducido número de mutaciones sobre la expresión y localización subcelular de MDR3 (Andress et al., 2013; Degiorgio et al., 2013; Delaunay et al., 2009; Gautherot et al., 2014; Kim et al., 2013). Sin embargo, los efectos sobre la actividad de la proteína apenas han sido explorados, debido a la dificultad para desarrollar ensayos *in vitro* que permitan determinar de forma fiable el transporte de fosfatidilcolina. Los primeros intentos realizados tenían como objetivo evaluar la especificidad de sustrato de MDR3. Para ellos se utilizaron análogos de fosfatidilcolina con una cadena corta de ácidos grasos para favorecer su extracción de las membranas y a los que se había unido un grupo fluorescente (NBD-PC) (vanHelvoort et al., 1996). Este abordaje demostró que el único fosfolípido que MDR3 traslocaba era PC, pero se observó que otros transportadores ABC, como MDR1, también eran capaces de traslocar NBD-PC, cuestionando la especificidad del ensayo. Descripciones posteriores confirmaron que, a diferencia de los fosfolípidos naturales, los análogos artificiales de PC marcados con compuestos fluorescentes podían ser reconocidos y transportados de forma inespecífica por distintos transportadores ABC (Borst, Elferink, 2002; Sharom et al., 1995). Para soslayar la dificultad en determinar de forma específica el transporte de PC, algunos autores han acudido a métodos indirectos, utilizando la proteína MDR1 como modelo de estudio del impacto de mutaciones en MDR3. MDR1 (*ABCB1*) es un transportador de membrana que media la excreción de diversas sustancias tóxicas para la célula, y es el responsable de la resistencia a fármacos en células tumorales (Binkhathlan, Lavasanifar, 2013). Debido a la importancia clínica de este hecho, las características moleculares de esta proteína se conocen en cierta profundidad y los ensayos de transporte

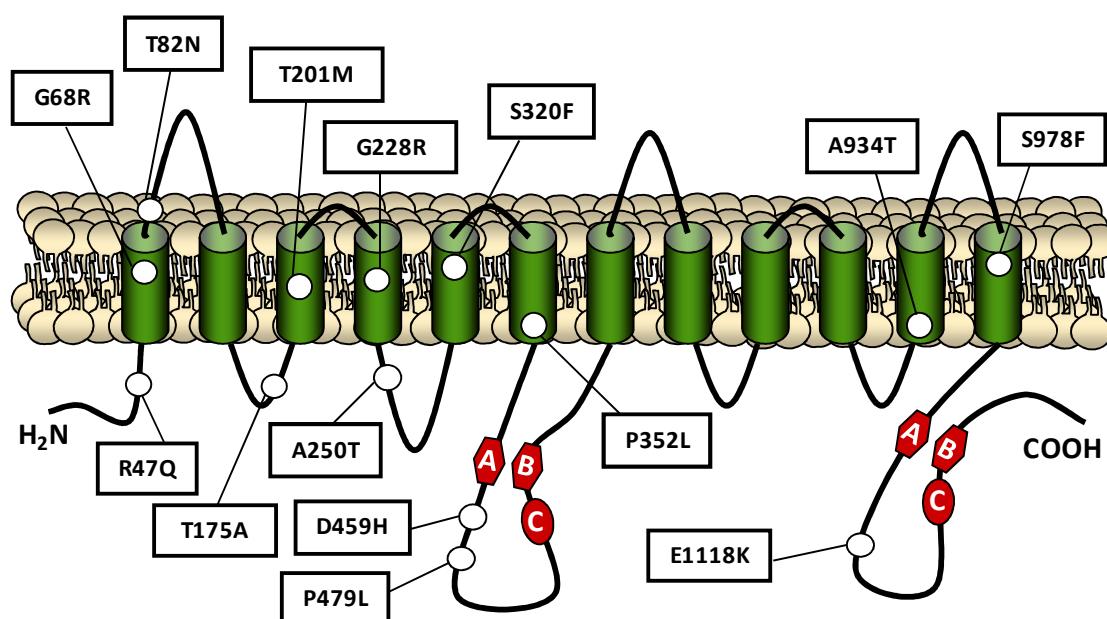
específico de sus sustratos están validados (Polli et al., 2001). MDR1 y MDR3 comparten una elevada homología a nivel de aminoácido (78% residuos idénticos) y conservan la misma organización en sus dominios (Vanderbliek et al., 1987). Sirviéndose de este modelo, un grupo francés introdujo en *ABCB1* la mutación de *ABCB4* I541F, identificada en un paciente con CIFP-3 (Delaunay et al., 2009; Gautherot et al., 2012). La proteína MDR1 mutante quedaba retenida en el retículo endoplásmico, pero mantenía la capacidad transportadora de sustrato. El residuo I541 se encuentra en el dominio de unión a ATP, una zona muy conservada en ambas proteínas, por lo que es presumible que el impacto de esta mutación en MDR3 sea similar al observado en MDR1. Sin embargo, para otras mutaciones, la fiabilidad de extrapolar a MDR3 los resultados obtenidos en MDR1 ha sido cuestionada (Ishigami et al., 2013).

La traslocación de PC natural y, por tanto, la actividad flopasa de MDR3, había sido evaluada, en el inicio de esta tesis, en un único estudio (Smith *et al.*, 1994). Smith y col. sometieron cultivos de fibroblastos que expresaban MDR3 a un marcaje metabólico con colina radioactiva. La PC radioactiva fue extraída de las membranas mediante adición de la proteína de transferencia de PC. En este método nos hemos basado para analizar la influencia de mutaciones *missense* sobre la actividad de MDR3. La colina es internalizada por las células e incorporada mayoritariamente a fosfatidilcolina (Li *et al.*, 2005); el isótopo radioactivo no altera la estructura de la molécula. La extracción de PC radioactiva de la superficie externa de las membranas se ha llevado a cabo mediante la adición de una sal biliar, que remeda la situación fisiológica en que se encuentra la membrana canalicular del hepatocito. De esta forma, en células que expresan MDR3, la diferencia en la radioactividad liberada al medio de cultivo en presencia y ausencia de la sal biliar representa una medida del grado de actividad flopasa para fosfatidilcolina.

En este trabajo hemos identificado 18 mutaciones en *ABCB4* en niños con enfermedades colestáticas de distinta gravedad y analizado *in vitro* el efecto de los cambios *missense* sobre la expresión, localización subcelular y actividad transportadora de PC de MDR3. Cuatro de estas mutaciones, G68R, G228R, D459H y A934T, producen la retención de la proteína en el retículo endoplásmico, según se evidencia en los análisis por inmunofluorescencia. Este fenómeno es característico de proteínas que sufren un plegamiento anómalo o presentan un cierto grado de “inmadurez”, que en las proteínas de membrana se refleja en una incompleta glicosilación (Braakman, Bulleid, 2011; Ferris *et al.*, 2014). Estas formas proteicas son reconocidas por la maquinaria celular y degradadas de forma prematura a través de la “ruta de degradación asociada a retículo endoplásmico” (Smith *et al.*, 2011). Esto

concuera con el análisis por *western blot* de la expresión de los cuatro mutantes: sus niveles se encuentran notablemente disminuidos respecto a la forma salvaje de la proteína, y en todos se aprecia un predominio de la forma inmadura. Como era de esperar, todos manifestaron una pérdida total de actividad MDR3.

El resto de mutaciones no comprometen la localización de MDR3 en la membrana apical, pero afectan en distinta medida a la actividad transportadora de PC. Los mutantes P352L y S978P muestran una ausencia total de funcionalidad, mientras que los mutantes R47Q, T82N, T175A, T201M, A250T, S320F, P479L y S978P retienen una cierta actividad. La cristalización de la proteína *mdr1* de ratón (Aller et al., 2009), que conserva un alto grado de homología con MDR3, y resultados de mutaciones experimentales realizadas en otros transportadores ABC (Aller et al., 2009) ofrecen algunos indicios de cómo estas mutaciones pueden influir sobre la actividad de MDR3. Como en la mayoría de transportadores ABC, la unidad funcional de MDR3 consta de dos dominios hidrofóbicos anclados a la membrana (TMD), cada uno de ellos con seis hélices  $\alpha$  transmembrana, y dos dominios citoplasmáticos de unión a ATP (NBD) (Rees et al., 2009) (Figura 25). Una de las zonas más conservadas en estos dominios es el denominado "Q-loop", un motivo definido por la secuencia VSQEP, que parece desempeñar un papel importante en la señalización entre el sitio activo de los NBDs y los dominios transmembrana y en la comunicación entre los dos NBDs (Lawson et al., 2008). La substitución del residuo de glutamato en la *mdr1* de ratón no afecta a la unión a ATP o al substrato, pero causa una reducción en la actividad ATPasa basal (es decir, libre de substrato) (Urbatsch et al., 2000). Los aminoácidos de MDR3 P479 y E1118 se localizan en este motivo, adyacentes al residuo de glutamato. Consecuentemente con lo expuesto, las mutaciones detectadas en nuestros pacientes P479L y E1118K no suprimen la actividad de MDR3, aunque provocan una disminución de un 82% y 61%, respectivamente. Cabe destacar que recientemente se ha descrito que la mutación L481R, localizada en el "Q-loop" del NBD1, también disminuye la actividad de MDR3 (Degiorgio et al., 2013).



**Figura 25:** Esquema de la estructura secundaria de MDR3 y localización de las mutaciones analizadas en este estudio (círculos blancos). En los dos sitios de unión a ATP citoplasmáticos, los motivos Walker A y B y la secuencia C, característicos de las proteínas ABC, están nombrados como A, B y C, respectivamente.

Los dominios transmembrana 6 (TM6) y 12 (TM12) (Figura 25) desempeñan un papel muy importante en la unión al sustrato y la hidrólisis de ATP (Crowley *et al.*, 2010). En la MDR1 humana, se han descrito diversas mutaciones localizadas en la hélice TM12 que disminuyen drásticamente la actividad ATPasa de la proteína (Crowley *et al.*, 2010). En la *mdr1* de ratón, el residuo S975 (ubicado en la TM12 y equivalente al S978 en humanos) interacciona de forma directa con sustratos específicos, como se observa en los estudios cristalográficos realizados (Aller *et al.*, 2009). Estos datos son consistentes con los obtenidos en la mutación S978P, que elimina completamente la actividad traslocadora de PC de MDR3. Respecto al dominio TM6, estudios iniciales realizados en la MDR1 humana mostraron que los residuos 330-351 son esenciales en la función transportadora de fármacos de esta proteína (Loo, Clarke, 1994). Posteriormente, se observó que los cambios conformacionales resultantes de sustituciones de residuos de prolina localizados en distintas posiciones del dominio podían alterar la actividad enzimática de MDR1 (Song, Melera, 2001). Estos hallazgos concuerdan con los resultados que hemos obtenido en los ensayos con la mutación P352L, localizada en este dominio, donde se evidencia una pérdida total de actividad MDR3. También se ha sugerido que el TM5 podría estar implicado en la unión del sustrato (Ecker *et al.*, 2002). De las mutaciones que hemos analizado, la S320F se localiza en este dominio. Sin embargo, esta

mutación no afecta a la capacidad traslocadora de PC en MDR3, sino que produce una disminución en la expresión de la proteína. El impacto de esta mutación ha sido analizado recientemente, con resultados idénticos a los obtenidos en nuestro estudio (Andress et al., 2013; Kim et al., 2013).

El resto de mutaciones que afectan a la actividad de MDR3 se localizan en zonas de la proteína cuyo papel en la funcionalidad de MDR3, o de otros transportadores ABC, se desconoce. No obstante, dado que la unión al sustrato ocurre preferentemente en los dominios transmembrana (TMDs), es probable que el residuo T201, localizado en el TM3 y cuya mutación produce una reducción del 70% en la actividad MDR3, esté implicado en la unión o traslocación de PC.

En las mutaciones R47Q, T82N, T175A y S320F, la disminución detectada en la actividad de MDR3 fue debida a la reducción en la expresión de la proteína. Esta conclusión se alcanza tras normalizar los valores de actividad por los niveles de proteína madura detectados en los ensayos de *western blot*. Es decir, estos cuatro mutantes son completamente activos. Las mutaciones T201M y P479L también se asocian a una reducción en la expresión de MDR3, pero los valores obtenidos no se correlacionan cuantitativamente con la disminución en la liberación de PC detectada en los ensayos de actividad. Estos resultados sugieren que ambas mutaciones afectan tanto a la expresión (o estabilidad) de MDR3 como a su funcionalidad.

La mutación A250T conlleva un aumento en los niveles de expresión proteica, detectándose en todos los ensayos realizados valores significativamente superiores a los de la proteína MDR3 salvaje. Sin embargo, la actividad neta que presenta la proteína mutante es aproximadamente un 90% inferior respecto a la MDR3 salvaje. El residuo A250 se localiza en el dominio intracelular 2 (ICD2) (Figura 25), una región conservada en las MDR3 de mamíferos y en la MDR1 humana. Esta región se compone de cuatro péptidos que conectan las hélices TM4-TM5 (Kast *et al.*, 1995; Kast *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1999). Parece que estos dominios intracelulares median el acoplamiento entre los cambios conformacionales de los NBDs y la reorientación de las hélices transmembrana durante la traslocación del sustrato (Dawson, Locher, 2006). Es, por tanto, factible que una mutación en esta región comprometa la funcionalidad de MDR3.

De los 67 niños estudiados por sospecha clínica de deficiencia de MDR3, hemos detectado mutaciones en *ABCB4* en 16 (aproximadamente un 27%). Porcentajes similares han sido descritos por otros grupos en distintas series de pacientes. En la serie que recoge el mayor número de casos analizados, procedentes de población europea, sólo se detectaron

mutaciones en *ABCB4* en 28 de 81 (34.5%) niños con diagnóstico de CIFP-3 (Colombo et al., 2011). En otra descripción de pacientes pertenecientes también a población europea, 17 de los 31 (54%) niños estudiados portaban defectos en *ABCB4* (Jacquemin et al., 2001). Estos resultados sugieren la existencia de otros genes, probablemente implicados en la formación de la bilis o en la regulación de MDR3, cuya mutación puede dar lugar a un fenotipo clínico similar a CIFP-3.

Varios estudios han documentado casos de CIFP-3 con mutaciones en *ABCB4* y expresión canalicular normal de MDR3 que muestran un fenotipo clínico menos grave y responden al tratamiento con AUDC (Colombo et al., 2011; Fang et al., 2012; Jacquemin et al., 2001). Se ha especulado con la posibilidad de que las mutaciones que portan estos niños no supriman totalmente la actividad traslocadora de PC, de forma que el tratamiento farmacológico sería efectivo si persiste una función residual de MDR3 (Gonzales et al., 2009; Jacquemin et al., 2001; Oude Elferink, Paulusma, 2007). Los datos resultantes del presente trabajo permiten establecer correlaciones genotipo-fenotipo y proporcionan evidencia experimental que apoya esta suposición. De las 18 mutaciones identificadas, 4 de ellas corresponden a pequeñas deleciones, a cambios que afectan al correcto *splicing* del gen, o a la introducción de un codón de parada prematuro que genera una forma truncada de la proteína. Es previsible que estas alteraciones den lugar a una MDR3 no funcional. Las 14 mutaciones restantes representan cambios *missense* que comprometen la correcta localización de MDR3 en la membrana apical o afectan en distinta medida a la actividad traslocadora de PC. Los niños en que se detectó una pérdida total (pacientes 1, 5, 6) o casi total (90%; paciente 8) de actividad de MDR3 manifestaron inicio temprano de enfermedad colestásica y daño hepático progresivo, refractario al tratamiento con AUDC, que hizo necesaria la realización de un trasplante hepático. Por el contrario, los pacientes 7 y 9, en los que se estimó una actividad total de MDR3 del 30% y 33%, respectivamente, permanecen asintomáticos tras más de 10 años de tratamiento con AUDC. Estos datos sugieren que un tercio de actividad en MDR3 es suficiente para conferir una respuesta favorable al tratamiento farmacológico crónico y evitar, por tanto, el trasplante hepático.

En 10 de los pacientes estudiados, la secuenciación completa de *ABCB4* arrojó la presencia de mutación en un único alelo. En todos los casos, el análisis por MLPA descartó la posibilidad de una mutación alternativa en el otro alelo consistente en inserciones/deleciones de exones. Aunque no se puede excluir que estos niños presentaran un defecto adicional en la región promotora o la deleción de una copia completa del gen, esto parece poco probable:

tales mutaciones conllevarían una reducción en la expresión de la proteína y los casos en que se ha podido analizar la biopsia hepática mostraban una tinción canalicular normal para MDR3. Mutaciones en heterocigosis en *ABCB4* han sido descritas también en niños diagnosticados de CIFP-3 (Colombo *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2012; Jacquemin *et al.*, 2001), y en individuos adultos afectados de diversas enfermedades hepatobiliares, como cirrosis biliar primaria (Lucena *et al.*, 2003; Ziol *et al.*, 2008), colangiocarcinoma (Tougeron *et al.*, 2012; Wendum *et al.*, 2012), fibrosis idiopática (Ziol *et al.*, 2008), ductopenia (Gotthardt *et al.*, 2008), colestasis gestacional (Bacq *et al.*, 2009; Jacquemin *et al.*, 1999), colestasis inducida por fármacos (Lang *et al.*, 2007), colelitiasis asociada a bajo nivel de fosfolípidos (LPAC) (Poupon *et al.*, 2013). Se desconoce por qué una deficiencia parcial de MDR3, consecuencia de mutaciones monoalélicas en *ABCB4*, da lugar a estos fenotipos clínicos. La hipótesis más extendida es que confieren susceptibilidad o predisponen a enfermedad colestásica, la cual se manifiesta ante factores o agresiones adicionales, tales como cambios hormonales, administración de fármacos o liberación de mediadores inflamatorios (Pauli-Magnus *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2009). Las colestasis inducidas por fármacos y las gestacionales que asocian a defectos de *ABCB4* serían ejemplos que apoyan esta teoría. La colestasis gestacional es una enfermedad benigna para la madre, pero reviste considerable gravedad para el feto, siendo frecuente la necesidad de adelantar el parto (Rioseco *et al.*, 1994). Se suele manifestar en el tercer trimestre de gestación y desaparece tras el parto, cuando se normaliza la elevación de los niveles estrógenos y progesterona (Wasmuth *et al.*, 2007). Niveles elevados de estas hormonas inhiben parcialmente la actividad de MDR3 (Evseenko *et al.*, 2007). En condiciones normales, esta inhibición no parece tener consecuencias patológicas, pero añadida a la deficiencia causada por una mutación monoalélica, la actividad MDR3 presumiblemente desciende por debajo del umbral necesario para mantener una adecuada función secretora hepática (Gonzales *et al.*, 2009; Trauner *et al.*, 2007). Esta función se normalizaría tras el descenso en la concentración de hormonas, que restauraría los niveles de actividad MDR3 anteriores al parto. El mismo argumento se ha utilizado para explicar los cuadros de colestasis observados en individuos heterocigotos para *ABCB4* cuando son tratados con fármacos que reducen la actividad MDR3 (Pauli-Magnus *et al.*, 2010). En estos casos, la interrupción del tratamiento farmacológico da lugar a la remisión de los síntomas colestásicos.

A pesar de estas evidencias, la implicación de variantes heterocigotas de *ABCB4* en el desarrollo de buena parte de las mencionadas enfermedades es cuestionada, dado que la mayoría representan cambios *missense* y no hay demostración experimental de que sean

realmente mutaciones y no variantes neutras (Hirschfield et al., 2013). Entre las substituciones *missense* de *ABCB4* identificadas en pacientes con diversos trastornos hepatobiliares figuran varias de las que han sido caracterizadas *in vitro* en el presente trabajo (Tabla 4). La demostración de que todas ellas impactan sobre la funcionalidad de MDR3 sustenta la participación de las mismas en las respectivas hepatopatías.

En relación con la posibilidad de que la manifestación de deficiencia de MDR3 en pacientes con mutaciones monoalélicas suceda cuando tiene lugar un insulto adicional que afecte a la expresión o funcionalidad del alelo normal, cabe mencionar que, en nuestra serie, cuatro de los niños con una única mutación en heterocigosis habían sido diagnosticados de otra enfermedad hepática (síndrome de Gilbert, síndrome de Noonan, deficiencia de alfa1-antitripsina o atresia biliar). Estos niños presentaban rasgos clínicos inusuales, sugerentes de deficiencia de MDR3, o evolución atípica de la enfermedad. En este contexto, recientemente ha sido descrito un caso raro de enfermedad de Cushing, que obedece a hiperplasia o tumor en la glándula pituitaria y está caracterizada por una marcada elevación de los niveles de cortisol, que presentaba con hepatitis colestática. Tras la resección del adenoma pituitario y normalización de los niveles de cortisol, se evidenció la remisión de la afectación hepática. A este paciente se le detectó una mutación en heterocigosis en *ABCB4*, y se atribuyó el cuadro colestásico a una inhibición de la expresión del alelo normal de *ABCB4* por las altas dosis de cortisol (Choudhary A Fau - Haafiz et al., 2014).

La caracterización funcional de los mutantes identificados en este trabajo ofrece la posibilidad de abordajes terapéuticos encaminados a rescatar el efecto de la mutación. Por ejemplo, para aquellas mutaciones que afectan a la expresión de la proteína sin comprometer a su actividad (T175A, S320F), la administración de agonistas de receptores nucleares que inducen la expresión de *ABCB4*, tales como FXR o PPAR $\alpha$  (Ghonem et al., 2014; Huang et al., 2003), podrían conducir a un incremento en la producción de proteína funcional. Los fibratos y un derivado del ácido quenodeoxicólico (6-ECDCA; obeticólico®) son ejemplos de compuestos de uso clínico con potencial aplicabilidad en pacientes que presenten estas mutaciones. Los primeros inducen la expresión de *ABCB4* a través de la activación de PPAR $\alpha$  (Chianale et al., 1996; Ghonem et al., 2014; Kok et al., 2003; Nakamuta et al., 2010; Shoda et al., 2007), aunque su utilización crónica puede aumentar el riesgo de formación de cálculos de colesterol (Caroli-Bosc et al., 2001). El 6-ECDCA es un potente agonista del receptor FXR (Pellicciari et al., 2002), un factor de transcripción que regula varios genes implicados en la formación de la bilis, entre ellos *ABCB4* (Huang et al., 2003). Este compuesto tiene un teórico potencial terapéutico en



trastornos colestásicos, de hecho ya se han obtenido resultados prometedores en ensayos clínicos con pacientes afectados de cirrosis biliar primaria (<http://clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00550862>; <http://clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00570765>).

Respecto a las mutaciones que causan un plegamiento anómalo de MDR3 y su retención en el retículo endoplásmico, podrían ser susceptibles de rescate con chaperonas químicas o farmacológicas. Tales compuestos tienen la capacidad de estabilizar la proteína mutante y promover su tránsito a la membrana apical (Morello *et al.*, 2000; Powers *et al.*, 2009; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2004; Welch, 2004). Diversos estudios *in vitro* han demostrado su capacidad para corregir defectos de plegamiento de transportadores canaliculares mutados (Gonzales, Jacquemin, 2010; Stapelbroek *et al.*, 2010). De los cuatro mutantes de MDR3 con retención en el retículo endoplásmico, al menos dos, G228R y A934T, son sugerentes de presentar defectos de plegamiento, dado que la incubación a baja temperatura conduce a su detección en la membrana apical. Asimismo, la localización en membrana de ambos mutantes es restaurada con dosis farmacológicas de dos compuestos de uso clínico con actividad chaperona, el 4-PBA y la curcumina. Aunque este hallazgo establece las bases para una posible acción terapéutica, sólo en el mutante G228R hemos observado recuperación en la actividad de MDR3, y ésta ha sido algo débil: la liberación de PC obtenida tras la adición del NaTC en células tratadas tanto con 4-PBA o con curcumina fue aproximadamente un 20% mayor que en células no tratadas. Del conjunto de resultados obtenidos se puede, por tanto, concluir que el tratamiento con estas chaperonas farmacológicas no es eficaz para todas las mutaciones que conllevan la retención de la proteína en el retículo endoplásmico. Por tanto, antes de proceder a su utilización en pacientes con este tipo de mutaciones, sería conveniente realizar análisis *in vitro* de funcionalidad. Aquellos casos en que se evidencie una recuperación funcional podrían beneficiarse de un tratamiento crónico con estos compuestos que evite la realización de un trasplante hepático. Incluso una recuperación parcial de la actividad de MDR3 podría permitir un nivel de secreción de PC compatible con el normal funcionamiento hepático, o susceptible de tratamiento con AUDC.

**Tabla 4. Mutaciones *missense* caracterizadas en este trabajo e identificadas en pacientes con distintas enfermedades hepatobiliares**

Mutación	Enfermedad	Referencia
R47Q	Colangitis recurrente Colelitiasis asociada a bajo nivel de fosfolípidos (LPAC)	(Wendum et al., 2012) (Poupon et al., 2013)
G68R	Mutación no descrita	
T82N	Mutación no descrita	
T175A	CIFP3 Colelitiasis asociada a bajo nivel de fosfolípidos (LPAC) Colestasis idiopática de adultos Colestasis inducida por fármacos Colestasis gestacional	(Colombo et al., 2011; Davit-Spraul et al., 2010) (Poupon et al., 2013; Rosmorduc et al., 2003; Rosmorduc et al., 2001) (Ziol et al., 2008) (Davit-Spraul et al., 2010) (Bacq et al., 2009; Davit-Spraul et al., 2010)
T201M	Mutación no descrita	
G228R	Mutación no descrita	
A250T	Mutación no descrita	
S320F	CIFP3 Colelitiasis asociada a bajo nivel de fosfolípidos (LPAC) Colestasis gestacional Colestasis inducida por fármacos Cirrosis biliar	(Colombo et al., 2011; Davit-Spraul et al., 2010) (Poupon et al., 2013; Rosmorduc et al., 2003; Rosmorduc et al., 2001) (Bacq et al., 2009; Keitel et al., 2006; Pauli-Magnus et al., 2004 (B); Zimmer et al., 2009) (Keitel et al., 2006; Rosmorduc et al., 2001) (Wendum et al., 2012)
P352L	Mutación no descrita	
D459H	Mutación no descrita	
P479L	CIFP3	(Davit-Spraul et al., 2010)
A934T	Colelitiasis asociada a bajo nivel de fosfolípidos (LPAC) Colestasis idiopática de adultos Colestasis gestacional	(Poupon et al., 2013; Rosmorduc et al., 2003; Rosmorduc et al., 2001) (Ziol et al., 2008) (Bacq et al., 2009; Davit-Spraul et al., 2010)

S978P	Colangiocarcinoma	(Tougeron et al., 2012)
E1118K	Mutación no descrita	



## **Conclusiones**



1. Un porcentaje elevado de pacientes pediátricos con enfermedad hepática sugerente de deficiencia de MDR3 no presenta mutaciones en el gen *ABCB4*.
2. Las mutaciones *missense* en *ABCB4* provocan distintos efectos sobre MDR3, comprometiendo su expresión, localización subcelular o actividad traslocadora de fosfatidilcolina.
3. El impacto diferencial de las mutaciones de *ABCB4* determina la evolución de la enfermedad hepática y la respuesta al tratamiento farmacológico. La pérdida total o casi total de funcionalidad de MDR3 hace necesaria la realización de un trasplante hepático; al menos un 30% de actividad MDR3 confiere una respuesta favorable al tratamiento crónico con ácido ursodeoxicólico.
4. La presencia de mutaciones en un único alelo de *ABCB4* puede predisponer o contribuir al desarrollo de enfermedad hepática colestática.
5. El tratamiento con chaperonas farmacológicas revierte *in vitro* el efecto de mutaciones específicas de *ABCB4* que afectan a plegamiento de la proteína y provocan su retención en el retículo endoplásmico.





## **Bibliografía**



- Alissa FT, Jaffe R, Shneider BL (2008) Update on progressive familial intrahepatic cholestasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **46**, 241-252.
- Alvarez L, Hierro L, Jara P (2009) Inherited cholestatic disorders. *International Hepatology Updates-Liver Diseases in children*, 39-51.
- Alvarez L, Jara P, Hierro L, *et al.* (2005) Molecular basis of cholestatic diseases of surgical interest. *Seminars in pediatric surgery* **14**, 200-205.
- Alvarez L, Jara P, Sanchez-Sabate E, *et al.* (2004) Reduced hepatic expression of farnesoid X receptor in hereditary cholestasis associated to mutation in ATP8B1. *Human Molecular Genetics* **13**, 2451-2460.
- Alvaro D, Cantafora A, Attili AF, *et al.* (1986) Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **83**, 551-554.
- Aller SG, Yu J, Ward A, *et al.* (2009) Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* **323**, 1718-1722.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ (2001) Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 28857-28865.
- Andress EJ, Nicolaou M, Romero MR, *et al.* (2013) Molecular mechanistic explanation for the spectrum of cholestatic disease caused by the S320F variant of ABCB4. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **59**, 1921-1931.
- Bacq Y, Gendrot C, Perrotin F, *et al.* (2009) ABCB4 gene mutations and single-nucleotide polymorphisms in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of Medical Genetics* **46**, 711-715.
- Balistreri WF, Bezerra M, Jansen P, *et al.* (2005) Intrahepatic cholestasis: summary of an American Association for the Study of Liver Diseases single-topic conference. *Hepatology* **42**, 222-235.
- Binkhathlan Z, Lavasanifar A (2013) P-glycoprotein Inhibition as a Therapeutic Approach for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: Current Status and Future Perspectives. *Current Cancer Drug Targets* **13**, 326-346.
- Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 537-592.

- Braakman I, Bulleid NJ (2011) Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. In: *Annual Review of Biochemistry, Vol 80* (eds. Kornberg RD, Raetz CRH, Rothman JE, Thorner JW), pp. 71-99.
- Brown CR, HongBrown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress & Chaperones* **1**, 117-125.
- Bull LN, van Eijk MJT, Pawlikowska L, *et al.* (1998) A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nature Genetics* **18**, 219-224.
- Carlton VEH, Pawlikowska L, Bull LN (2004) Molecular basis of intrahepatic cholestasis. *Annals of Medicine* **36**, 606-617.
- Caroli-Bosc FX, Le Gall P, Pugliese P, *et al.* (2001) Role of fibrates and HMG-CoA reductase inhibitors in gallstone formation epidemiological - Study in an unselected population. *Digestive Diseases and Sciences* **46**, 540-544.
- Colombo C, Vajro P, Degiorgio D, *et al.* (2011) Clinical Features and Genotype-Phenotype Correlations in Children With Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 3 Related to ABCB4 Mutations. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **52**, 73-83.
- Crowley E, O'Mara ML, Kerr ID, Callaghan R (2010) Transmembrane helix 12 plays a pivotal role in coupling energy provision and drug binding in ABCB1. *Febs Journal* **277**, 3974-3985.
- Chen F, Ananthanarayanan M, Emre S, *et al.* (2004) Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity. *Gastroenterology* **126**, 756-764.
- Chianale J, Vollrath V, Wielandt AM, *et al.* (1996) Fibrates induce mdr2 gene expression and biliary phospholipid secretion in the mouse. *Biochemical Journal* **314**, 781-786.
- Choudhary A Fau - Haafiz A, Haafiz A Fau - Ramakrishnaiah R, Ramakrishnaiah R Fau - Thrailkill K, Thrailkill K (2014) Cushing's disease presenting as cholestatic hepatitis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* doi: 10.1515/jpem-2014-0200.
- Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E (2009) Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **4**.
- Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E (2010) The Spectrum of Liver Diseases Related to ABCB4 Gene Mutations: Pathophysiology and Clinical Aspects. *Seminars in Liver Disease* **30**, 134-146.

- Dawson P, Shneider B, Hoffman A (2006) Bile formation and the enterohepatic circulation. *Elsevier Academic Press, San Diego CA*, 1437-1462.
- Dawson RJP, Locher KP (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**, 180-185.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research* **11**, 1156-1166.
- Degiorgio D, Corsetto PA, Rizzo AM, *et al.* (2013) Two ABCB4 point mutations of strategic NBD-motifs do not prevent protein targeting to the plasma membrane but promote MDR3 dysfunction. *European Journal of Human Genetics* **22**, 633-639.
- Delaunay J-L, Durand-Schneider A-M, Delautier D, *et al.* (2009) A Missense Mutation in ABCB4 Gene Involved in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 3 Leads to a Folding Defect that Can Be Rescued by Low Temperature. *Hepatology* **49**, 1218-1227.
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, *et al.* (1992) Processing of mutant cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761-764.
- Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, *et al.* (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research* **37**.
- Ecker GF, Csaszar E, Kopp S, *et al.* (2002) Identification of ligand-binding regions of P-glycoprotein by activated-pharmacophore photoaffinity labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Molecular Pharmacology* **61**, 637-648.
- Egawa H, Yorifuji T, Sumazaki R, *et al.* (2002) Intractable diarrhea after liver transplantation for Byler's disease: Successful treatment with bile adsorptive resin. *Liver Transplantation* **8**, 714-716.
- Elferink R, Ottenhoff R, Vanwijland M, *et al.* (1995) Regulation of biliary lipid secretion by MDR2 P-glycoprotein in the mouse *Journal of Clinical Investigation* **95**, 31-38.
- Elferink R, Tytgat GNJ, Groen AK (1997) The role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport. *Faseb Journal* **11**, 19-28.
- Eppens EF, van Mil SWC, de Vree JM, *et al.* (2001) FIC1, the protein affected in two forms of hereditary cholestasis, is localized in the cholangiocyte and the canalicular membrane of the hepatocyte. *Journal of Hepatology* **35**, 436-443.
- Evans WH (1980) A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **604**, 27-64.

- Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA (2007) Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 595-601.
- Falguières T, Ait-Slimane T, Housset C, Maurice M (2014) ABCB4: Insights from pathobiology into therapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **38**, 557-563.
- Fang L-J, Wang X-H, Knisely AS, *et al.* (2012) Chinese Children With Chronic Intrahepatic Cholestasis and High gamma-Glutamyl Transpeptidase: Clinical Features and Association With ABCB4 Mutations. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **55**, 150-156.
- Ferris SP, Kodali VK, Kaufman RJ (2014) Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Disease Models & Mechanisms* **7**, 331-341.
- Frankenberg T, Miloh T, Chen FY, *et al.* (2008) The Membrane Protein ATPase Class I Type 813 Member 1 Signals Through Protein Kinase C Zeta To Activate the Farnesoid X Receptor. *Hepatology* **48**, 1896-1905.
- Gautherot J, Delautier D, Fau - Maubert M-A, Maubert Ma Fau - Ait-Slimane T, *et al.* (2014) Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: Insights from disease-causing mutations. *Hepatology* **60**, 610-621.
- Gautherot J, Durand-Schneider AM, Delautier D, *et al.* (2012) Effects of Cellular, Chemical, and Pharmacological Chaperones on the Rescue of a Trafficking-defective Mutant of the ATP-binding Cassette Transporter Proteins ABCB1/ABCB4. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 5070-5078.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M (2007) Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1773**, 283-308.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, *et al.* (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 10046-10050.
- Ghonem NS, Ananthanarayanan M, Soroka CJ, Boyer JL (2014) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha Activates Human Multidrug Resistance Transporter 3/ATP-Binding Cassette Protein Subfamily B4 Transcription and Increases Rat Biliary Phosphatidylcholine Secretion. *Hepatology* **59**, 1030-1042.
- Gonzales E, Davit-Spraul A, Baussan C, *et al.* (2009) Liver diseases related to MDR3 (ABCB4) gene deficiency. *Frontiers in Bioscience* **14**, 4242-4256.

- Gonzales E, Grosse B, Cassio D, *et al.* (2012) Successful mutation-specific chaperone therapy with 4-phenylbutyrate in a child with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Journal of Hepatology* **57**, 695-698.
- Gonzales E, Jacquemin E (2010) Mutation specific drug therapy for progressive familial or benign recurrent intrahepatic cholestasis: A new tool in a near future? *Journal of Hepatology* **53**, 385-387.
- Gotthardt D, Runz H, Keitel V, *et al.* (2008) A mutation in the canalicular phospholipid transporter gene, ABCB4, is associated with cholestasis, ductopenia, and cirrhosis in adults. *Hepatology* **48**, 1157-1166.
- Groen A, Rodriguez Romero M, Kunne C, *et al.* (2011) Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology* **141**, 1927-1937.
- Hasegawa Y, Hayashi H, Naoi S, *et al.* (2014) Intractable itch relieved by 4-phenylbutyrate therapy in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 1. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **9**, doi:10.1186/1750-1172-1189-1189.
- Hayashi H, Sugiyama Y (2007) 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology* **45**, 1506-1516.
- Hirschfield GM, Chapman RF-K, Tom H., Karlsen Th Fau - Lammert F, *et al.* (2013) The genetics of complex cholestatic disorders. *Gastroenterology* **144**, 1357-1374.
- Huang L, Zhao A, Lew JL, *et al.* (2003) Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 51085-51090.
- Ishigami M, Tominaga Y, Nagao K, *et al.* (2013) ATPase activity of nucleotide binding domains of human MDR3 in the context of MDR1. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**, 683-690.
- Jacquemin E (2012) Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **36**, S26-S35.
- Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, Boute O, Hadchouel M (1999) Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet* **353**, 210-211.
- Jacquemin E, de Vree JML, Cresteil D, *et al.* (2001) The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: From neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* **120**, 1448-1458.

- Jang GH, Kim TH, Choe Y, Ham A, Choi JH (2012) Functional characterization of genetic variations in the MDR3 promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **430**, 1312-1318.
- Jansen PLM, Strautnieks SS, Jacquemin E, *et al.* (1999) Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **117**, 1370-1379.
- Karijolic J, Yu Y-T (2014) Therapeutic suppression of premature termination codons: Mechanisms and clinical considerations (Review). *International Journal of Molecular Medicine* **34**, 355-362.
- Karpen SJ (2002) Nuclear receptor regulation of hepatic function. *Journal of Hepatology* **36**, 832-850.
- Kast C, Canfield V, Levenson R, Gros P (1995) Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of mdr3. *Biochemistry* **34**, 4402-4411.
- Kast C, Canfield V, Levenson R, Gros P (1996) Transmembrane organization of mouse P-glycoprotein determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 9240-9248.
- Keitel V, Vogt C, Haussinger D, Kubitz R (2006) Combined mutations of canalicular transporter proteins cause severe intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* **131**, 624-629.
- Kerem E, Hirawat S, Armoni S, *et al.* (2008) Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* **372**, 719-727.
- Kim TH, Park HJ, Choi JH (2013) Functional Characterization of ABCB4 Mutations Found in Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis (LPAC). *Korean Journal of Physiology & Pharmacology* **17**, 525-530.
- Klein I, Sarkadi B, Varadi A (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1461**, 237-262.
- Klomp LWJ, Vargas JC, van Mil SWC, *et al.* (2004) Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology* **40**, 27-38.
- Knisely AS, Strautnieks SS, Meier Y, *et al.* (2006) Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency. *Hepatology* **44**, 478-486.



- Kok T, Bloks VW, Wolters H, *et al.* (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha)-mediated regulation of multidrug resistance 2 (Mdr2) expression and function in mice. *Biochemical Journal* **369**, 539-547.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**, 322-342.
- Lang C, Meier Y, Stieger B, *et al.* (2007) Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenetics and Genomics* **17**, 47-60.
- Lang T, Haberl M, Jung D, *et al.* (2006) Genetic variability, haplotype structures, and ethnic diversity of hepatic transporters MDR3 (ABCB4) and bile salt export pump (ABCB11). *Drug Metabolism and Disposition* **34**, 1582-1599.
- Lawson J, O'Mara ML, Kerr ID (2008) Structure-based interpretation of the mutagenesis database for the nucleotide binding domains of P-glycoprotein. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1778**, 376-391.
- Li F, Patterson AD, Krausz KW, Tanaka N, Gonzalez FJ (2012) Metabolomics reveals an essential role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in bile acid homeostasis. *Journal of Lipid Research* **53**, 1625-1635.
- Li ZY, Agellon LB, Vance DE (2005) Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 37798-37802.
- Loo TW, Clarke DM (1994) Mutations to amino acids located in predicted transmembrane segment 6 (TM6) modulate the activity and substrate specificity of human P-glycoprotein. *Biochemistry* **33**, 14049-14057.
- Lucena JF, Herrero JI, Quiroga J, *et al.* (2003) A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology* **124**, 1037-1042.
- Maggiore G, Bernard O, Hadchouel M, Lemonnier A, Alagille D (1991) Diagnostic value of serum gamma-glutamyl transpeptidase activity in liver diseases in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **12**, 21-26.
- Maggiore G, Bernard O, Riely CA, *et al.* (1987) Normal serum gamma-glutamyl-transpeptidase activity identifies groups of infants with idiopathic cholestasis with poor prognosis. *Journal of Pediatrics* **111**, 251-252.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, *et al.* (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **284**, 1362-1365.

- Martinez-Fernandez P, Hierro L, Jara P, Alvarez L (2009) Knockdown of ATP8B1 expression leads to specific downregulation of the bile acid sensor FXR in HepG2 cells: effect of the FXR agonist GW4064. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **296**, G1119-G1129.
- Meier PJ (1988) Transport Polarity of Hepatocytes. *Semin Liver Dis* **8**, 293-307.
- Morello JP, Petaja-Repo UE, Bichet DG, Bouvier M (2000) Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**, 466-469.
- Morita S-y, Kobayashi A, Takanezawa Y, *et al.* (2007) Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4. *Hepatology* **46**, 188-199.
- Morita S-y, Terada T (2014) Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *Biomed Research International* **2014**, **954781**, doi:10.1155/2014/954781.
- Morotti RA, Suchy FJ, Magid MS (2011) Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (PFIC) Type 1, 2, and 3: A Review of the Liver Pathology Findings. *Seminars in Liver Disease* **31**, 3-10.
- Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, *et al.* (2013) Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **145**, 574-582.
- Nakamuta M, Fujino T, Yada R, *et al.* (2010) Therapeutic effect of bezafibrate against biliary damage: a study of phospholipid secretion via the PPAR alpha-MDR3 pathway. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **48**, 22-28.
- Naoi S, Hayashi H, Inoue T, *et al.* (2014) Improved liver function and relieved pruritus after 4-phenylbutyrate therapy in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Journal of Pediatrics* **164**, 1219-1227.
- Noe J, Stieger B, Meier PJ (2002) Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* **123**, 1659-1666.
- Norez C, Antigny F, Becq F, Vandebrouck C (2006) Maintaining low Ca<sup>2+</sup> level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. *Traffic* **7**, 562-573.
- Oude Elferink RP, Ottenhoff R, van Wijland M, *et al.* (1996) Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of mdrl P-glycoprotein. *Journal of Lipid Research* **37**, 1065-1075.

- Oude Elferink RPJ, Paulusma CC (2007) Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflügers Archiv : European journal of physiology* **453**, 601-610.
- Pauli-Magnus C, Kerb R, Fattinger K, *et al.* (2004(A)) BSEP and MDR3 haplotype structure in healthy Caucasians, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* **39**, 779-791.
- Pauli-Magnus C, Lang T, Meier Y, *et al.* (2004 (B)) Sequence analysis of bile salt export pump (ABCB11) and multidrug resistance p-glycoprotein 3 (ABCB4, MDR3) in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pharmacogenetics* **14**, 91-102.
- Pauli-Magnus C, Meier PJ, Stieger B (2010) Genetic determinants of drug-induced cholestasis and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Seminars in Liver Disease* **30**, 147-159.
- Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ (2005) Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *Journal of Hepatology* **43**, 342-357.
- Paulusma CC, Groen A, Kunne C, *et al.* (2006) Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology* **44**, 195-204.
- Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, *et al.* (2002) 6 alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **45**, 3569-3572.
- Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, *et al.* (2001) Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **299**, 620-628.
- Poupon R, Rosmorduc O, Boelle PY, *et al.* (2013) Genotype-phenotype relationships in the low-phospholipid-associated cholelithiasis syndrome: a study of 156 consecutive patients. *Hepatology* **58**, 1105-1110.
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. In: *Annual Review of Biochemistry*, pp. 959-991.
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O (2009) ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 218-227.
- Rioseco AJ, Ivankovic MB, Manzur A, *et al.* (1994) Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a retrospective case-control study of perinatal outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **170**, 890-895.
- Rosmorduc O, Hermelin B, Boelle PY, *et al.* (2003) ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology* **125**, 452-459.

- Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R (2001) MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* **120**, 1459-1467.
- Rubenstein RC, Zeitlin PL (1998) A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in Delta F508-homozygous cystic fibrosis patients - Partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **157**, 484-490.
- Rubenstein RC, Zeitlin PL (2000) Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, 259-267.
- Ruetz S, Gros P (1994) Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. *Cell* **77**, 1071-1081.
- Ruetz S, Gros P (1995) Enhancement of MDR2-mediated phosphatidylcholine translocation by the bile-salt taurocholate-implications for hepatic bile formation. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25388-25395.
- Sharom FJ, Yu XH, Chu JWK, Doige CA (1995) Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochemical Journal* **308**, 381-390.
- Shoda J, Okada K, Inada Y, et al. (2007) Bezafibrate induces multidrug-resistance P-Glycoprotein 3 expression in cultured human hepatocytes and humanized livers of chimeric mice. *Hepatology Research* **37**, 548-556.
- Shyu A-B, Wilkinson MF, van Hoof A (2008) Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *Embo Journal* **27**, 471-481.
- Silveira MG, Lindor KD (2014) Obeticholic acid and budesonide for the treatment of primary biliary cirrhosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **15**, 365-372.
- Smit JJM, Mol C, Vandeemter L, et al. (1995) Characterization of the promoter region of the human MDR3 P-glycoprotein gene. *Biochim Biophys Acta*. **1261**, 44-56.
- Smit JJM, Schinkel AH, Elferink R, et al. (1993) Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **75**, 451-462.
- Smith AJ, de Vree JML, Ottenhoff R, et al. (1998) Hepatocyte-specific expression of the human MDR3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in Mdr2 (-/-) mice. *Hepatology* **28**, 530-536.

- Smith AJ, Timmermans-Hereijgers J, Roelofsen B, *et al.* (1994) The human MDR3 p-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma-membrane of fibroblasts from transgenic mice. *Febs Letters* **354**, 263-266.
- Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS (2011) Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science* **334**, 1086-1090.
- Song JM, Melera PW (2001) Further characterization of the sixth transmembrane domain of Pgp1 by site-directed mutagenesis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **48**, 339-346.
- Stapelbroek JM, van Erpecum KJ, Klomp LWJ, Houwen RHJ (2010) Liver disease associated with canalicular transport defects: Current and future therapies. *Journal of Hepatology* **52**, 258-271.
- Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, *et al.* (1998) A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature Genetics* **20**, 233-238.
- Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, *et al.* (2008) Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* **134**, 1203-1214.
- Thompson R, Strautnieks S (2001) BSEP: Function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Seminars in Liver Disease* **21**, 545-550.
- Tougeron D, Fotsing G, Barbu V, Beauchant M (2012) ABCB4/MDR3 gene mutations and cholangiocarcinomas. *Journal of Hepatology* **57**, 467-468.
- Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiological Reviews* **83**, 633-671.
- Trauner M, Fickert P, Wagner M (2007) MDR3 (ABCB4) defects: A paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Seminars in Liver Disease* **27**, 77-98.
- Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Brothers SP, Conn PM (2004) Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: Implications for the treatment of human disease. *Traffic* **5**, 821-837.
- Urbatsch IL, Gimi K, Wilke-Mounts S, Senior AE (2000) Investigation of the role of glutamine-471 and glutamine-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein. *Biochemistry* **39**, 11921-11927.
- van den Berghe PVE, Stapelbroek JM, Krieger E, *et al.* (2009) Reduced Expression of ATP7B Affected by Wilson Disease-Causing Mutations Is Rescued by Pharmacological Folding Chaperones 4-Phenylbutyrate and Curcumin. *Hepatology* **50**, 1783-1795.

- van der Velden LM, Stapelbroek JM, Krieger E, *et al.* (2010) Folding Defects in P-Type ATP 8B1 Associated with Hereditary Cholestasis Are Ameliorated by 4-Phenylbutyrate. *Hepatology* **51**, 286-296.
- van Mil SWC, Houwen RHJ, Klomp LWJ (2005) Genetics of familial intrahepatic cholestasis syndromes. *Journal of Medical Genetics* **42**, 449-463.
- Vanderbliek AM, Baas F, Delange TT, *et al.* (1987) The human mdr3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *Embo Journal* **6**, 3325-3331.
- Vanderbliek AM, Kooiman PM, Schneider C, Borst P (1988) Sequence of mdr3 cDNA encoding a human P-glycoprotein. *Gene* **71**, 401-411.
- vanHelvoort A, Smith AJ, Sprong H, *et al.* (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**, 507-517.
- Wagner M, Zollner G, Trauner M (2009) New molecular insights into the mechanisms of cholestasis. *Journal of Hepatology* **51**, 565-580.
- Wasmuth HE, Glantz A, Keppeler H, *et al.* (2007) Intrahepatic cholestasis of pregnancy: the severe form is associated with common variants of the hepatobiliary phospholipid transporter ABCB4 gene. *Gut* **56**, 265-270.
- Welch EM, Barton ER, Zhuo J, *et al.* (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**, 87-U86.
- Welch WJ (2004) Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15**, 31-38.
- Wendum D, Barbu V, Rosmorduc O, *et al.* (2012) Aspects of liver pathology in adult patients with MDR3/ABCB4 gene mutations. *Virchows Archiv* **460**, 291-298.
- Zimmer V, Muellenbach R, Simon E, *et al.* (2009) Combined functional variants of hepatobiliary transporters and FXR aggravate intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Liver International* **29**, 1287-1288.
- Ziol M, Barbu V, Rosmorduc O, *et al.* (2008) ABCB4 heterozygous gene mutations associated with fibrosing cholestatic liver disease in adults. *Gastroenterology* **135**, 131-141.
- Zollner G, Trauner M (2009) Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *British Journal of Pharmacology* **156**, 7-27.

**Anexo**





Artículos a los que ha dado lugar esta Tesis Doctoral:

Gordo-Gilart R, Andueza S, Hierro L, Martínez-Fernández P, D'Agostino D, Jara P, Alvarez L. Functional analysis of ABCB4 mutations relates clinical outcomes of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 to the degree of MDR3 floppase activity. *Gut* 2015;64:147–155.

Frider B, Castillo A, Gordo-Gilart R, Bruno A, Amante M, Alvarez L, Verónica Mathet V. Reversal of advanced fibrosis after long-term ursodeoxycholic acid therapy in a patient with residual expression of MDR3. Aceptado en *Ann Hepatol*.

Gordo-Gilart R, Hierro L, Andueza S, Muñoz-Bartolo G, López C, Díaz C, Jara P, Álvarez L. Heterozygous *ABCB4* mutations in children with cholestatic liver disease: identification and in vitro phenotyping. Enviado a publicar.

Gordo-Gilart R, Andueza S, Hierro L, Jara P, Alvarez L. Pharmacological chaperones rescue impaired membrane targeting and function of specific ABCB4 missense mutations. Enviado a publicar.